

جداسازی آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری (RGAs) در سیب‌زمینی با استفاده از روش Motif Directed Profiling و تهیه نقشه ژنتیکی آن‌ها

Isolation of Resistance Gene Analogues (RGAs) in Potato Using Motif Directed Profiling Method and development of Their Genetic Map

سارا دژستان^۱، سید ابوالقاسم محمدی^۲، محمد مقدم^۳، سعید اهری‌زاد^۴ و
ژاک اچ. وسن^۵

۱- دانشجوی سابق دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۲، ۳ و ۴- به ترتیب استاد، استاد و دانشیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۵- محقق موسسه بین‌المللی تحقیقات گیاهی، واگنینگن، هلند

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۴/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۰/۱۰

چکیده

دژستان، س.، محمدی، س.، مقدم، م.، اهری‌زاد، س.، وسن، ج.، اچ. ۱۳۸۹. جداسازی آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری (RGAs) در سیب‌زمینی با استفاده از روش Motif directed Profiling و تهیه نقشه ژنتیکی آن‌ها. مجله به‌نژادی نهال و بدر ۱-۲۶: ۱۲۱-۱۰۵.

استفاده از ارقام مقاوم یکی از راه‌کارهای اصلی کاهش خسارت ناشی از تنش‌های زیستی در گیاهان است. لازمه تولید چنین ارقامی شناسایی، جداسازی و مکان‌یابی ژن‌های مقاومت به بیماری است. در این پژوهش، برای جداسازی آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری در سیب‌زمینی از روش Motif directed Profiling (Mdp) استفاده شد. بدین منظور، هفت آغازگر دژنره طراحی شده براساس دامنه حفاظت‌شده TIR ژن‌های مقاومت به بیماری گیاهی برای تکثیر آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری در ۴۶ نتاج F1 حاصل از تلاقی دو والد دیپلوئید هتروزیگوت (SH) 83-92-488 و (RH) 89-039-16 با حداکثر نوترکیبی مورد استفاده قرار گرفت. در مجموع ۴۵۴ نشانگر چندشکل حاصل شد که با استفاده از نقشه پیوستگی AFLP جمعیت متشکل از ۱۰۰۰۰ نشانگر، مکان‌یابی شدند. برای شناسایی RGAها تعدادی از نوارها جداسازی و توالی‌یابی شدند که ۶۶/۱۱ درصد آن‌ها (۱۶۰ نوار) تشابه معنی‌دار با ژن‌های مقاومت شناخته‌شده و RGAها داشتند و اغلب این RGAها در نواحی ژنومی سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی دارای خوشه‌های RGA مکان‌یابی شدند. نقشه پیوستگی این RGAها در ارتباط با نقشه پیوستگی فوق‌اشباع این جمعیت با ۱۰۰۰۰ نشانگر AFLP نشان داد که اغلب این RGAها در خوشه‌ها یا زیرخوشه‌های جدید یا موجود در نقشه گروه‌بندی شدند. تعداد ۱۱۷ نشانگر در مکان‌های منطبق با خوشه‌های ژن‌های مقاومت روی کروموزوم‌های ۵، ۶، ۹ و ۱۱ و همچنین ۱۵ نشانگر در جایگاه تقریبی مکان‌های ژنی کمتی مقاومت موجود در کروموزوم‌های ۱، ۲، ۴ و ۷ مکان‌یابی شدند. اکثریت این RGAها، معرف توالی‌های RGA جدید بودند. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در مکان‌یابی ژن‌های مقاومت منفرد و مکان‌های کمی مقاومت به بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: سیب‌زمینی، آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری (RGAs)، Motif directed Profiling.

مقدمه

تولید و استفاده از ارقام مقاوم یکی از راه‌کارهای اصلی و عملی کنترل بیماری‌ها در گیاهان زراعی و کاهش خسارات ناشی از آن‌ها است. لازمه چنین عملی، شناسایی، مکان‌یابی و جداسازی ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها جهت استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی است. پیشرفت‌های اخیر در زمینه بیولوژی مولکولی ابزارهای مناسب و مکمل را برای روش‌های کلاسیک اصلاحی برای تولید ارقام مقاوم فراهم کرده است.

با مقایسه توالی‌های اسیدهای آمینه پروتئین‌های رمز شده توسط ژن‌های مقاومت همسانه شده در گیاهان با منشاء تکاملی مختلف مشخص شده است که ژن‌های مقاومت براساس مشابهت‌های ساختاری تولیدات پروتئینی به گروه‌های NBS-LRR (Nucleotide Binding Site- Leucien-) (Rich Repeats)، LRR خارج سلولی، LRR-kinase و گیرنده کینازی طبقه‌بندی می‌شوند (Dangl, 1995). مطالعات ژنومی آشکار کرده است که گروه‌های NBS-LRR، LRR خارج سلولی و LRR-kinase در سرتاسر ژنوم گیاهان وجود دارند (Young, 2000). گروه NBS-LRR به وسیله حضور دو دامنه حفاظت شده، یک جایگاه اتصال به نوکلئوتید (NBS) در انتهای آمینی و یک تکرار غنی از لوسین (LRR) با طولی تغییرپذیر در انتهای کربوکسیل مشخص می‌شود و بزرگ‌ترین گروه ژن‌های مقاومت در گیاهان

را تشکیل می‌دهد (Hulbert *et al.*, 2001). پروتئین‌های مقاومت NBS-LRR دارای دو ساختار دامنه‌ای مشخص در انتهای آمینی هستند: اولین ساختار دامنه تول/اینترلوکین-۱/گیرنده (Toll/Interleukin-1/Receptor:) (TIR) است که ژن‌های رمز کننده آن، ژن‌های TIR-NBS-LRR (TNL) نامیده می‌شوند و دومی یک ساختار Coiled-coil (CC) است و ژن‌های رمز کننده این نوع ساختارها، به ژن‌های (CNL) CC-NBS-LRR یا non-TIR معروف هستند (Hammond-Kosack and Jones, 1997). این گروه‌ها در ابتدا در گوجه‌فرنگی، توتون و آراییدوپسیس از طریق همسانه‌سازی براساس نقشه ژنتیکی (Map-based cloning) یا مکان‌یابی با استفاده از ترانسپوزون (Transposon tagging) شناسایی شدند. شرط لازم زیربنایی برای این روش‌های همسانه‌سازی نه تنها برای بسیاری از گیاهان زراعی بلکه برای خویشاوندان وحشی آن‌ها نیز که می‌توانند منابع با ارزشی از ژن‌های مقاومت جدید باشند فراهم نیست. با وجود این، آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت (Resistance Gene Analogues: RGAs) می‌توانند به آسانی از طریق تشابه توالی شناسایی شوند. دامنه‌های عملکردی معین (برای مثال، دامنه NBS، LRR و TIR) حتی در میان ژن‌های مقاومت برخوردار از خویشاوندی دور به شدت حفاظت شده‌اند (Conserved)، بنابراین RGAها می‌توانند از

۱۲ کروموزوم سیب‌زمینی شناسایی شده‌اند. برخی QRL‌ها به بیمارگرهای مختلف با یکدیگر و یا با جایگاه‌های متراکم مقاومت پیوسته هستند. جب‌هاردت و والکونن (Gebhardt and Valkonen, 2001) براساس گروه‌بندی ژنتیکی QRL‌ها با ژن‌های مقاومت پیشنهاد کردند که برخی QRL‌ها اساس مولکولی مشابه با ژن‌های مقاومت منفرد دارند. مکان‌یابی ژن‌های مقاومت سیب‌زمینی دارای توالی مشابه با ژن‌های مقاومت همسانه‌شده دیگر گیاهان و دیگر ژن‌های وابسته به مقاومت مشخص کرده است که بین ژن‌های RGA کاندیدا، ژن‌های مقاومت و QRL‌ها پیوستگی وجود دارد. بنابراین، شناسایی RGA‌ها، شناسایی نشانگرهای مفید برای گزینش براساس نشانگر در اصلاح سیب‌زمینی را امکان‌پذیر می‌سازد (Kuhn *et al.*, 2003؛ Gebhardt and Valkonen, 2001؛ Simko *et al.*, 2007) و تا سال ۲۰۰۶ هشت ژن مقاومت مختلف در سیب‌زمینی همسانه شده‌اند که تمام آن‌ها از گروه NBS-LRR هستند. ژن‌های همسانه شده در مقاومت به بیماری‌های ناشی از ویروس‌ها، نماتدها و آمیست‌ها نقش داشتند (Simko *et al.*, 2007). تخمین زده می‌شود که ژنوم سیب‌زمینی واجد حداقل ۲۰۰-۱۰۰ ژن از این گروه است (Gebhardt and Valkonen, 2001).

هدف این تحقیق استفاده از روش Mdp برای تولید نشانگرهای ژنتیکی جدید در

طریق رهیافت‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز جداسازی شوند (Leister *et al.*, 1996). یکی از روش‌های جدید برای جداسازی RGA‌ها، روش Motif directed Profiling (Mdp) است. در این روش یک آغازگر دژنره منفرد که موتیف‌های اختصاصی حفاظت‌شده را هدف قرار می‌دهد با یک آدپتور که به یک جایگاه برش آنزیمی متصل است ترکیب می‌شود (van der Linden *et al.*, 2004). در این پژوهش آغازگرهای دژنره براساس هم‌ردیفی توالی‌های DNA موتیف‌های حفاظت‌شده TIR ژن‌های مقاومت، از درون این توالی‌ها طراحی شده‌اند. این روش یک الگوی نشانگری چندمکانی تولید می‌کند که با قسمت بزرگ‌تری از یک مجموعه متنوع از ژن‌های مقاومت و قطعات RGA سازگار است. در این روش قطعات RGA به آسانی از ژل جداسازی و به‌صورت مستقیم توالی‌یابی می‌شوند (Van der Linden *et al.*, 2004).

تاکنون ۳۹ ژن منفرد غالب مقاومت و ۶۵ مکان ژنی کمی مقاومت (Quantitative Resistance Locus: QRL) اعطاکننده مقاومت به ویروس‌ها، نماتدها و قارچ‌ها در سیب‌زمینی با استفاده از نشانگرهای مولکولی مکان‌یابی شده‌اند. اغلب این ژن‌ها در پنج جایگاه متراکم (Hotspots) مقاومت در ژنوم سیب‌زمینی قرار گرفته‌اند. QRL‌های برخی بیماری‌ها مانند بلایت دیررس، پوسیدگی غده و نماتدهای سیست ریشه روی

تقسیم شدند (Van Os *et al.*, 2006)؛
Isidore *et al.*, 2003). به منظور استخراج
DNA ژنومی، مریستم برگ‌گی از گیاهان
گلخانه‌ای پنج هفته‌ای برداشت شد و
ژنومی طبق روش فولتون و همکاران
(Fulton *et al.*, 1995) استخراج شد.

روش Motif directed Profiling (Mdp)

روش Mdp روی DNA ژنومی بر اساس
روش ون‌در لیندن و همکاران
(van der Linden *et al.*, 2004) انجام شد.
DNA با استفاده از آنزیم‌های برشی
AluI، MseI، RsaI، HaeIII و TaqI تیمار
شد. برای تکثیر RGAها از آغازگرهای دژنره
طراحی شده براساس هم‌ردیفی توالی‌های
DNA موتیف‌های حفاظت شده TIR، استفاده
شد (جدول ۱). جداسازی و آشکارسازی
محصولات تکثیری به وسیله ژل پلی‌آکرلامید
۶ درصد با استفاده از دستگاه Li-Cor انجام
شد. امتیازدهی نوارهای چندشکل مشاهده شده
براساس وجود و عدم وجود نوار در نتاج انجام
شد. نشانگرهای RGA کاندیدا با استفاده از
روش مکان‌یابی حداکثر درست‌نمایی
(Maximum likelihood mapping) به نقشه
UHD منتسب شدند (van Os *et al.*, 2006).

جداسازی و تجزیه RGAها

برای جداسازی نوارهای چندشکل، والدین
SH و RH با تمام ترکیب‌های آنزیم/آغازگر
(آغازگرها با P^{33} نشانمند شده بودند)
مورد استفاده در ژل پلی‌آکرلامید بارگذاری
شدند. پس از انطباق ژل پلی‌آکرلامید با

جمعیت در حال تفرق سیب‌زمینی SH×RH
حاصل از تلاقی دو والد دیپلوئید-92-SH83-
488(SH) و RH89-039-16(RH) و
مکان‌یابی نشانگرهای دارای همولوژی با
ژن‌های TIR-NBS-LRR، RGAها و دیگر
نشانگرهای وابسته به ژن‌های مقاومت بود.
همچنین شناسایی RGAها در خوشه‌های ژنی
شناخته شده و نیز شناسایی خوشه‌های ژنی
مقاومت جدید احتمالی مدنظر بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA

به منظور مکان‌یابی
گزینشی (Selective mapping)، ۴۶
ژنوتیپ از جمعیت F1 در حال
تفرق SH×RH سیب‌زمینی حاصل از تلاقی
والدین دیپلوئید هتروزیگوت
SH83-92-488(SH) و RH89-039-16(RH)
(Roupe van der Voort *et al.*, 1997) با
حداکثر نوترکیبی با استفاده از نرم‌افزار
MapPop (Vision *et al.*, 1999) انتخاب
شدند. والدین جمعیت از بین تلاقی‌های
مختلف انجام شده در دانشگاه واگنینگن کشور
هلند براساس حداکثر مقدار نوترکیبی در
جمعیت، انتخاب شده بودند. در نقشه ژنتیکی
فوق اشباع (Ultra High Density: UHD)
این جمعیت متشکل از تقریباً ۱۰۰۰۰
نشانگر AFLP، کروموزوم‌های
سیب‌زمینی به حدود ۹۰۰ جایگاه
(Bins) با فاصله ۰/۸ سانتی‌مورگان

ژل‌های Li-Cor مربوطه، نوارهای چندشکل مشخص از ژل پلی‌آکرلامید بریده و پس از اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول TE در دمای °C ۹۷ برای پنج دقیقه قرار گرفتند. این قطعات مجدداً با آغازگرهای اختصاصی TIR و آغازگر آداپتور تکثیر شدند و محصولات تکثیری حاصل روی ژل آگارز تفکیک شدند. توالی‌یابی قطعات به صورت مستقیم با استفاده از آغازگر آداپتور به عنوان آغازگر توالی‌یابی و با کیت BigDye Terminator و دستگاه توالی‌یابی خودکار ABI3700 (Applied Biosystems (USA)) انجام شد. هم‌ردیفی توالی‌ها از طریق مقایسه آن‌ها با داده‌های اسیدنوکلئیک و پروتئین در پایگاه NCBI (National Center for Biotechnology Information) با استفاده از برنامه‌های Blastx و tBlastx تعیین شد (Altschul *et al.*, 1997). روابط فیلوژنی بین توالی‌های نوکلئوتیدی RGAهای نشانگرهای TIR با استفاده از برنامه MegAlign نرم‌افزار DNASTar و الگوریتم Neighbor-Joining بررسی شد. این الگوریتم به علت دقت و سرعت محاسباتی بالا مورد استفاده قرار گرفت (Tamura *et al.*, 2004).

پیوستگی AFLP جمعیت اضافه شد (شکل ۱ و جدول ۱). متوسط LOD در مکان‌یابی برابر با ۶/۷۵ بود. ۱۸۳ نشانگر اختصاصی والد RH، ۱۸۵ نشانگر اختصاصی والد SH و ۸۶ نشانگر در هر دو والد مشاهده شد. برای تایید هویت نشانگرها، برخی از قطعات توالی‌یابی شدند که ۲۴۲ نشانگر از کل نشانگرها دارای توالی معتبر قابل خواندن بودند. هم‌ردیفی توالی‌ها با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI نشان داد که ۱۶۰ نشانگر تشابه معنی‌داری با ژن‌های مقاومت شناخته شده و RGAها داشتند. از ۱۶۰ توالی حاصل، ۶۳ توالی در والد RH، ۶۹ توالی در والد SH و ۲۸ توالی در هر دو والد مشاهده شدند (شکل ۲ و جدول ۲).

اکثریت این RGAها، معرف توالی‌های RGA جدید بودند. بیشتر این نشانگرها در جایگاه‌هایی که سابقاً به وسیله لیستر و همکاران (Leister *et al.*, 1996) و جب‌هاردت و الکونین (Gebhardt and Valkonen, 2001) در سیب‌زمینی و پنبه و همکاران (Pan *et al.*, 2000) در گوجه‌فرنگی توصیف شده‌اند، مکان‌یابی شدند (شکل ۲).

در جایگاه SH1.3، سه نشانگر چند شکل NST9256 دارای همولوژی با "فاکتور ۱ شبه AP2 واکنش به زخم (Wound-responsive AP2 like factor 1)" شناسایی شدند. خانواده فاکتور نسخه‌برداری AP2، فقط در گیاهان وجود دارد و شامل چند ژن رمزکننده پروتئین‌های درگیر در تنظیم مسیرهای مقاومت به بیماری

نتایج و بحث

از هفت آغازگر TIR مورد استفاده، پنج آغازگر بین والدین چندشکل بودند. با استفاده از ۲۴ ترکیب آنزیم/آغازگر، در کل ۴۵۴ نوار چندشکل در جمعیت شناسایی و به نقشه

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی TIR، آنزیم‌های مورد استفاده برای برش DNA، تعداد نوارهای چندشکل، تعداد توالی‌های معتبر و تعداد توالی‌های معتبر که تشابه معنی‌داری با RGAها یا ژن‌های مقاومت شناخته‌شده نشان دادند

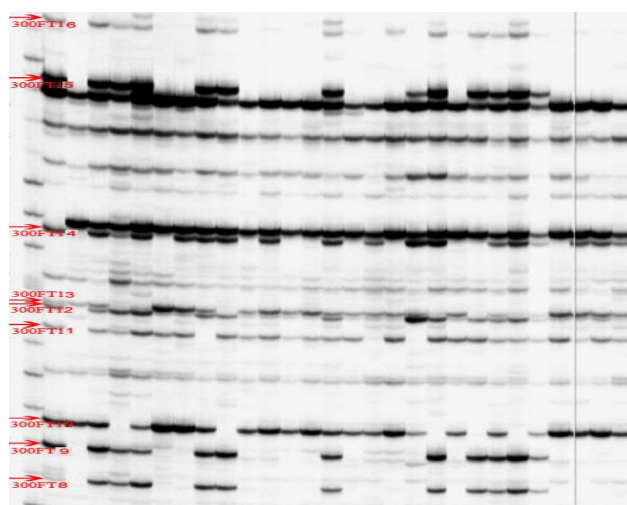
Table 1. Specific TIR primers, enzymes used for cutting DNA, number of polymorphic bands, number of reliable sequences and number of reliable sequences that exhibited significant similarity with RGAs or known resistance genes

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال	آنزیم	نوارهای چندشکل	توالی‌های معتبر	≠RGA
Primer	Primer sequence	AT (°C)	Enzyme	Polymorphic bands	Reliable sequences	
TIR300F	nTAGTrAAGAyATGGAATGC	55	AluI, MseI, RsaI, HaeIII, TaqI	109	65	47
TIR300Fc	TAGTrAAGATyATGGAATGC A	55	AluI, MseI, RsaI, HaeIII, TaqI	63	40	33
TIR270F	TATGCTACrTCd AGnTGGTGC	55	AluI, MseI, RsaI, HaeIII, TaqI	-	-	-
NST9256	ATGGCATCTTCTTCTTCTTCT TT	55	AluI, MseI, RsaI, HaeIII, TaqI	94	48	29
POTIR3R	CTTCACTAnTTCATyCAAGCA CC	55	AluI, MseI, RsaI, HaeIII, TaqI	87	38	22
TIR wcF	AGAATTAYrCiACrTCiAGrTGG TG	52	AluI, MseI, RsaI, HaeIII	101	51	29
TIR wcR	ATCTTyACTAvTTCATTCArC ACCA	39	AluI, MseI, RsaI, HaeIII	-	-	-
Total				454	242	160

≠RGA: تعداد توالی‌های معتبر که تشابه معنی‌داری با RGAها یا ژن‌های مقاومت شناخته‌شده نشان دادند.

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

AT: Annealing Temperatures.

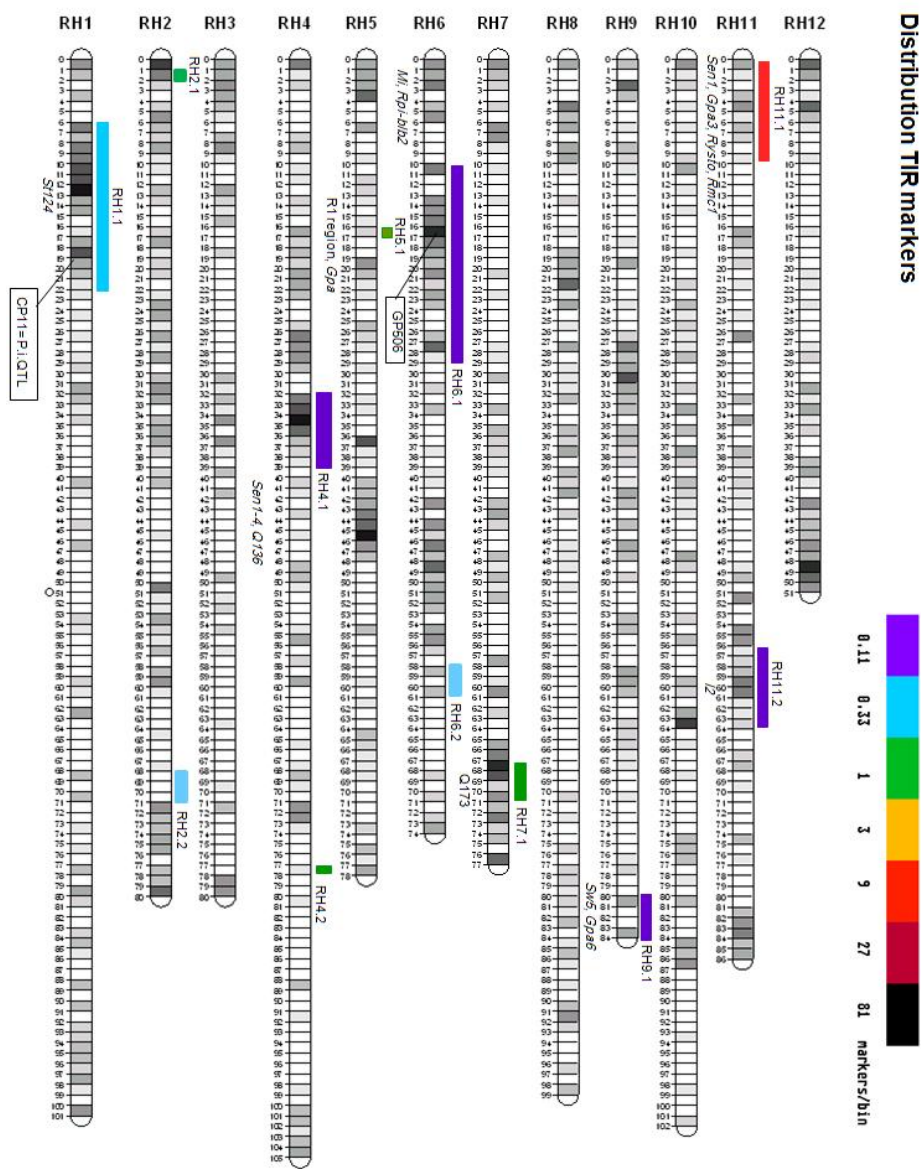


شکل ۱- الگوی نواری تعدادی از افراد جمعیت با استفاده از ترکیب آنزیم *TaqI* و آغازگر TIR300F در ژل Li-Cor. پیکان‌ها جایگاه‌های نوارهای چندشکل را نشان می‌دهند که در میان ژنوتیپ‌ها ردیابی شده‌اند. سه چاهک اول از سمت چپ به ترتیب عبارتند از نشانگر وزن مولکولی، والد RH و والد SH و بقیه چاهک‌ها مربوط به ۴۶ فرد از جمعیت است.

Fig. 1. The banding pattern of some individuals of the population using combination of *TaqI* enzyme and TIR300F 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.

مختلف بادنجانیان (Solanaceae) همسانه‌سازی شده‌اند (Starks *et al.*, 1997) که در واکنش‌های تغلیظ هیدروکربن‌های مختلف شرکت می‌کنند (van der Hoeven *et al.*, 2000). در جایگاه RH4.2 نشانگر 3RT8 با "پروتئین مشابه سرپین (Serpine-like protein)" همولوژی نشان داد. سرپین‌های گیاهی احتمالاً در دفاع مستقیم در مقابل پروتئینازهای حشرات و بیمارگرها و در تنظیم رخداد هضم پروتئینی درون‌زاد (Endogenous proteolytic) عمل می‌کنند اما هیچ عملکردی تاکنون برای سرپین‌های گیاهی به اثبات نرسیده است (Roberts and Hejgaard, 2008). همکاران (Ahn *et al.*, 2009) نقش جدیدی را برای سرپین‌های گیاهی عنوان می‌کنند که احتمالاً در بازداشتن پروتئینازهای درون‌زاد (Endogenous proteinases) ویژه‌ای که اسیدآمینوهای گلیسین و سیستئین را هدف قرار می‌دهند درگیر هستند تا پاسخ‌های گیاه به تخریب DNA در نتیجه الکیل‌دار شدن (Alkylating DNA damage) را تنظیم کنند. به اعتقاد کالنج و همکاران (2005 Calenge *et al.*) به احتمال زیاد در چنین مواردی چند نوار مجزا در MDP ممکن است دارای طول یکسان با توالی متفاوت بوده و به آسانی قابل تفکیک نباشند. بنابراین، توالی‌های به دست آمده در این جا نمی‌توانند با اطمینان به عنوان یک نشانگر MDP تلقی شوند.

(Disease resistance pathways) است (Gutterson and Reuber, 2004). همچنین در جایگاه‌های RH1.1 و SH7.1 سه نشانگر TIRwcf با "۱-فسفاتیدیل اینوزیتول-۴-فسفات ۵-کیناز" که یک پیام‌بر ثانویه است همولوژی نشان دادند. مسیر ترارسانی پیام‌های مولکولی عمومی با دریافت پیام آغاز می‌شود و به دنبال آن پیام‌برهای ثانویه برای مثال، اینوزیتول فسفات‌ها (Inositol phosphates) تولید می‌شوند. هر چند که ژن‌های *TNL* نیز در مسیرهای پیام رسانی نقش دارند ولی دارای تشابه بسیار اندک با "فاکتور ۱ شبه AP2 واکنش به زخم" و "۱-فسفاتیدیل اینوزیتول-۴-فسفات ۵-کیناز" هستند که این امر ممکن است موجب اتصال غیراختصاصی آغازگر و تکثیر غیراختصاصی شود، زیرا مکان‌های ژنی مشابه با "فاکتور ۱ شبه AP2 واکنش به زخم" و "۱-فسفاتیدیل اینوزیتول-۴-فسفات ۵-کیناز" به ترتیب فقط محصول آغازگرهای NST9256 و TIRwcf هستند و در محصولات دیگر آغازگرهای TIR مشاهده نشده‌اند و این موضوع دلیلی بر شباهت ساختاری این ژن‌ها با ژن‌های *TNL* نمی‌شود. در جایگاه SH1.3 نشانگر TIR300FcR4 با ژن رمزکننده "انتقال‌دهنده پتاسیم" هم‌ردیف شد. نشانگر TIR300FM22 در جایگاه RH9.1 و SH9.2 مکان‌یابی شد که با "سِسکوئیتِرین سنتاز (Sesquiterpene synthase 2)" همولوژی داشت. چند سِسکوئیتِرین سنتاز از گونه‌های



شکل ۲- جایگاه‌های نسبی RGAها در نقشه فوق اشباع سبب‌زمینی RH (a) و SH (b). هر کروموزوم شامل جایگاه‌هایی است که تعداد متفاوتی نشانگرهای AFLP دارد. تعداد نشانگرها در هر جایگاه به وسیله سایه خاکستری (سایه سفید، صفر و در سایه سیاه بیش از ۵۰۰ نشانگر وجود دارد) نشان داده شده است. خطوط راست هر کروموزوم جایگاه نسبی RGAها را نشان می‌دهد. جایگاه‌های *Sen1-4*, *Rpi-blb2*, *Gpa6*, *Gpa3*, *Sen1*, *RYsto*, *ST124*, *Rmc1*, *R1*، *Gpa* و *R3a/b* از سیب‌زمینی و جایگاه‌های *Tm-2*، *Mi*، *Q173*، *Sw5*، *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*, *Rpi-blb2*, *Gpa6*, *Gpa3*, *Sen1*, *RYsto*, *ST124*, *Rmc1*, *R1*, *Gpa* and *R3a/b* from potato and positions of *Tm-2*, *Mi*, *Q173*, *Sw5*, *I2* and *Q136* from tomato were identified and indicated in the left part of each chromosome.

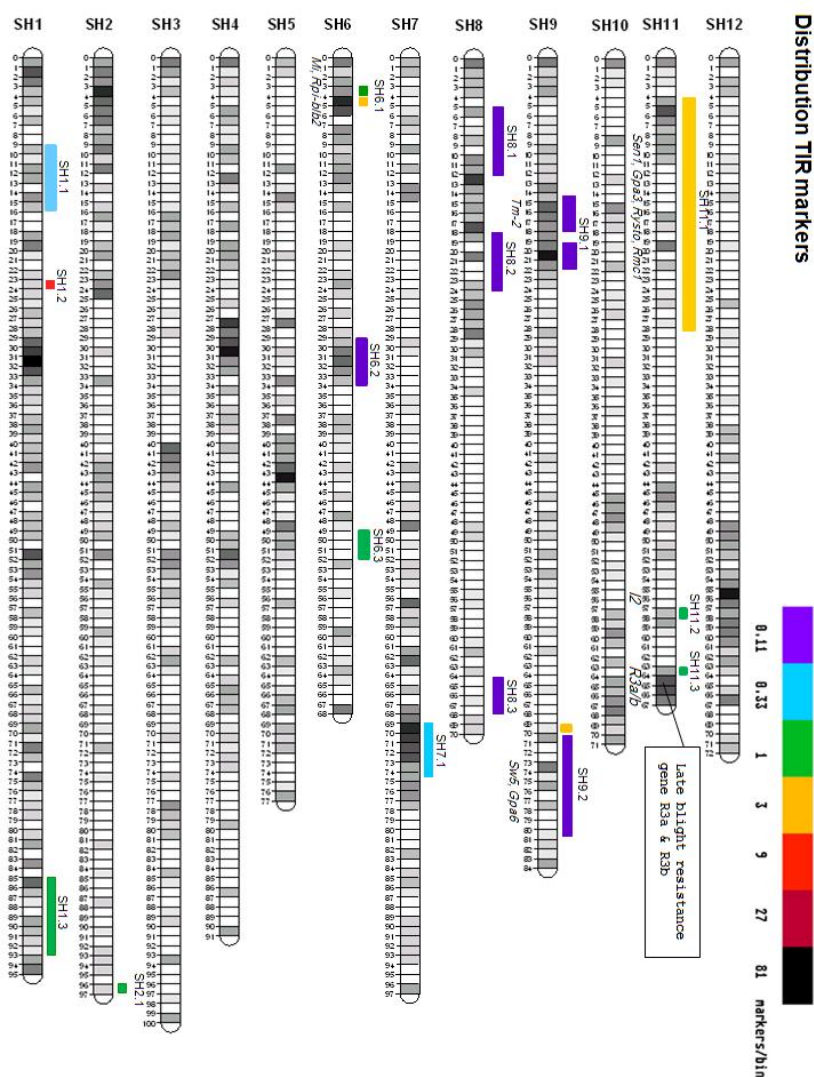


Fig. 2. Continued

ادامه شکل ۲

شکستگی یا نوآرایی در طی تکامل یا احتمالاً در نتیجه ورود ویروس از دست داده‌اند (Gowda *et al.*, 2002) یا این که توالی‌های مذکور احتمالاً محصولات غیراختصاصی تکثیری هستند که از اتصال غیراختصاصی آغازگرها یا تکثیر تصادفی ناشی می‌شوند (Pflieger *et al.*, 1999).

تجزیه روابط فیلوژنی توالی‌های نوکلئوتیدی RGAهای نشانگرهای TIR به

دوازده نشانگر با پروتئین رتروترانسپوزون همولوژی داشتند و نشانگر 3RT12 در کروموزوم ۹ در والد SH با پروتئین رتروترانسپوزون و ژن‌های مقاومت همردیف شدند. توالی‌های مشابه رتروترانسپوزون در نواحی غیررمزکننده ژن *Xa21* برنج نیز گزارش شده است (Song *et al.*, 1998). این نشانگرها ممکن است ژن‌های مقاومت ازین رفته‌ای باشند که عملکرد خود را به علت

جدول ۲- RGA های دارای همولوژی معنی‌دار با ژن‌های مقاومت شناخته‌شده. نشانگرهای TIR300F، TIR300Fc، NST9256، POTIR3R و TIRwcF به اختصار به صورت 300F، 300Fc، 9256، 3R و wcF نشان داده شده‌اند

Table 2. The RGAs having significant homology with known resistance genes. TIR300F, TIR300Fc, NST9256, POTIR3R and TIRwcF markers are showed as 300F, 300Fc, 9256, 3R and wcF, respectively

جایگاه Locus	فاصله Bin (Interval)	آغازگر/آنزیم Primer/Enzyme	شماره دسترسی توالی های همولوگ Homologue accession number	E میزان تشابه و ارزش Score (bits) & E value
RH1.1	7-22	3RA3, 300FH11, 300FT11, 9256A12, wcFM8, wcFR23, wcFH13, wcFM7	gb AAW28561.2 TMV resistance protein gb AAR21295.1 bacterial spot disease resistance protein 4 emb CAA08798.1 NL27 emb CAA08797.1 NL25 TIR-NBS-LRR type disease resistance protein	49.7-110 (2e-14 to 1e-47) 107-111 (3e-22 to 5e-48) 66.6-117 (3e-19 to 5e-51) 80.5-129 (5e-14 to 3e-54)
RH1.1	19-22	wcFR41	ref NP_195050.3 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase	74.3 (3e-12)
RH2.1	2	wcFH17	gb EEF42975.1 leucine-rich repeat-containing protein	90.9 (4e-17)
RH2.2	69-71	300FR24	emb CAA08798.1 NL27 [<i>Solanum tuberosum</i>]	87.8 (3e-16)
RH4.1	33-39	3RR6	gb AAW28561.2 TMV resistance protein	110 (1e-47)
RH4.2	78	3RT8	gb AAN76362.1 serpin-like protein	102 (9e-21)
RH5.1	17	300FR22	gb AAW28561.2 TMV resistance protein N	87.8 (3e-16)
RH6.1	11-29	3RA4,3RR11, 300FM19	emb CAA08798.1 NL27 [<i>Solanum tuberosum</i>] emb CAA08797.1 NL25 [<i>Solanum tuberosum</i>] TIR-NBS-LRR type disease resistance protein	94.7 (2e-18) 86.7 (7e-16)
RH6.2	59-61	300FcH12, 300FcH14	gb AAW28561.2 TMV resistance protein N	78.6-81.6 (2e-21 to 3e-22)
RH7.1	68-71	300FA20,300FM13	gb AAW28561.2 TMV resistance protein N	61.6 (2e-08)
RH9.1	81-84	300FM22	gb AAG41892.1 AF279456_1 sesquiterpene synthase 2	65.1 (4e-13)
RH11.1	1-10	300FcM1,9256M28,9256M29,9256M30,9256M31,300FA10,300FA12, 300FA17, 300FcH7, 300FcM10, 300fcR15, 300fcR2, 300fcR3, 300fcR6, 300FM16, 300FM21,300FM4, 300FR25, 300FR5, 300FR6, 3RH14, 300FR8, 300FT12, 300FT15, 300FT8, 3RH20, 3RR7, 3RT14, 9256A11, 9256A9, 9256M26,9256R22, 9256T10, 300FcH11, 300FcM11, 300FT10, 3RH18, 3RT11, 9256M25,300FA16,300FcM13, 300FcM4, 300FcM5, 300FcM6, 300FcM8, 300fcR10, 300FM10, 300FM24, 300FT4, 300FT9, 3RH30, 300fcR8, wcFR42, wcFM9, wcFM26, wcFR19, wcFR32, wcFR47, wcFM6, wcFH8	gb AAW28561.2 TMV resistance protein gb AAR21295.1 bacterial spot disease resistance protein 4 emb CAA08798.1 NL27 emb CAA08797.1 NL25 TIR-NBS-LRR type disease resistance protein	110-210 (1e-47 to 9e-53) 111-205 (4e-51 to 5e-48) 117-204 (2e-52 to 5e-51) 129 (3e-54)
RH11.2	33	wcFR39	emb CAA08798.1 NL27	85.5 (4e-26)
RH11.3	57-64	300FcM7, 300FM17	gb AAW28561.2 TMV resistance protein N	54.3-62.8 (1e-11 to 9e-10)
SH1.1	10-16	wcFH14, wcFM8, wcFR23	emb CAA08798.1 NL27 dbj BAD12594.1 N gb AAR21295.1 N protein	66.6 (3e-19) 84.7-129 (2e-15 to 7e-29) 73.2-103 (7e-12 to 5e-21)
SH1.2	24	300FH12, 300FM9, 300FT3, 3RH6, 9256H5	gb AAW28561.2 TMV resistance protein gb AAR21295.1 bacterial spot disease resistance protein 4 emb CAA08798.1 NL27 emb CAA08797.1 NL25 TIR-NBS-LRR type disease resistance protein	102-210 (9e-21 to 9e-53) 107-205 (3e-22 to 4e-51) 92.0-204 (2e-17 to 5e-51) 80.5-129 (5e-14 to 3e-54)
SH1.3	86-93	9256T5, 9256A7, 9256H3 300fcR4	dbj BAF48803.1 wound-responsive AP2 like factor 1 gb EEF30896.1 Potassium transporter	38.5-96.3 (0.21 to 1e-18) 95.5 (2e-19)
SH2.1	97	300FR24	emb CAA08798.1 NL27	87.8 (3e-16)
SH6.1	4-5	300FH6, 300fcR14, 300FM20, 3RH17	gb AAW28561.2 TMV resistance protein N	42.4-111 (4e-06 to 3e-23)
SH6.2	30-34	wcFR22	emb CAA08798.1 NL27 dbj BAD12594.1 N	112 (9e-24) 101 (3e-20)
SH6.3	50-52	300FcH12, 300FcH14	gb AAW28561.2 TMV resistance protein N	81.6 (3e-22)
SH7.1	70-75	300FcA5, 300FM14 wcFH15, wcFR38	gb AAW28561.2 TMV resistance protein N ref NP_195050.3 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase	61.6 (2e-08) 74.3 (3e-12)
SH8.1	6-12	9256R17	dbj BAF36717.1 S locus F-box protein	41.6 (0.026)
SH8.2	19-24	300FcH8	gb AAR21295.1 bacterial spot disease resistance protein 4 gb AAW28561.2 TMV resistance protein N	145 (2e-63) 138 (3e-63)
SH8.3	65-68	9256H10	ref XP_002273095.1 hypothetical protein	114 (2e-24)
SH9.1	15-18 19-22	3RT12 9256M19	gb AAW28561.2 TMV resistance protein gb AAR21295.1 bacterial spot disease resistance protein 4 emb CAA08798.1 NL27 emb CAA08797.1 NL25	210 (9e-53) 205 (4e-51) 204 (5e-51) 129 (3e-54)
SH9.2	70 71-81	wcFA4, wcFH12 300FM22	dbj BAD12594.1 N protein gb AAG41892.1 AF279456_1 sesquiterpene synthase 2	58.2- 69.3 (1e-10 to 3e-07) 65.1 (4e-13)

Table 2. Continued

ادامه جدول ۲

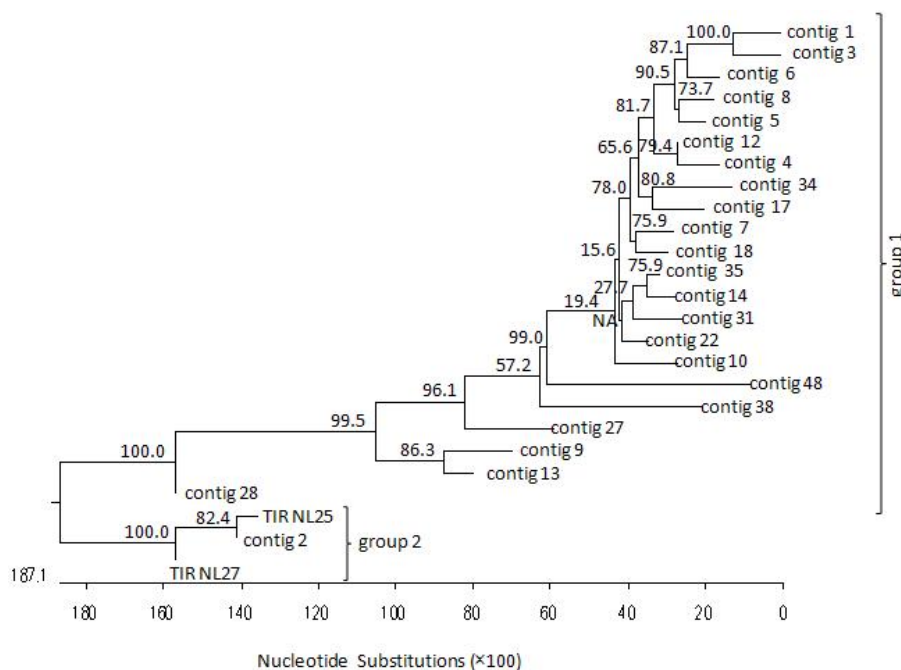
SH11.1	5-28	300FcH5, 300FcH6, 9256R23, 300FcH3, 300FcM12, 3RT11, wcFR42, 300FcM14, 300fcR13, 300fcR17, 300fcR5, 300fcR7, 3RT7, 300FH2, 300FH9, 300FM18, 300FM25, 300FR14, 300FR15, 300FR16, 3RT13, 300FR18, 300FR23, 300FR27, 300FT7, 3RA6, 3RH19, 3RR8, 3RT10, 3RT15, 9256H12, 9256H2, 9256M22, 9256M17, 3RH18, 9256M18, 9256M24, 9256M27, 9256T7, 300FcM1, 9256M28, 9256M29, 300fcR15, 300fcR6, 300FR25, 300FcM11, 300FT10, 9256M25, 300FA16, 300FcM4, 300FcM8, 300fcR10, 300FM10, 9256H2, wcFH6, wcFM24, wcFH7, wcFM20, wcFR24, wcFR27, wcFR37, wcFM6, wcFR39,	gb AAW28561.2 TMV resistance protein gb AAR21295.1 bacterial spot disease resistance protein 4 emb CAA08798.1 NL27 emb CAA08797.1 NL25 TIR-NBS-LRR type disease resistance protein	110-210 (1e-47 to 9e-53) 111-205 (5e-48 to 4e-51) 112-204 (2e-52 to 9e-24) 129-134 (3e-30 to 3e-54)
SH11.2	58	wcFM9	gb AAW28561.2 TMV resistance protein N, putative	134 (3e-30)
SH11.3	64	wcFM26	emb CAA08797.1 NL25 emb CAA08798.1 NL27	129 (9e-29) 102 (9e-21)

وجود این، در برخی از جایگاه‌ها این فاصله برای تعدادی از نشانگرها به بیش از یک جایگاه افزایش یافت. بنابراین، به علت کمبود داده‌های نشانگری برای افرادی که در این فاصله نوترکیب بودند، مکان‌یابی دقیق‌تر ممکن نشد. با وجود این، دقت مورد نظر برای نشان دادن یک ناحیه ژنتیکی تقریبی که نشانگر و نیز یک مکان ژنی مقاومت در آن قرار گیرد کافی است. علاوه بر این، مشخص شده است که در جمعیت کلیه افراد در تمام فاصله‌های مورد نظر نوترکیب بودند. بنابراین، با افزایش تعداد افراد F1 در آزمایش می‌توان دقت مکان‌یابی را افزایش داد (Brugmans *et al.*, 2008).

مطالعات ژنتیک کلاسیک ثابت کرده است که بسیاری از ژن‌های مقاومت در ژنوم گیاهان به صورت خوشه‌ای قرار دارند (Hulbert *et al.*, 2001). توالی‌یابی ژنوم ثابت کرد که اکثریت ژن‌های رمزکننده پروتئین‌هایی با دامنه NBS-LRR در ژنوم‌های آراییدوپسیس و برنج خوشه‌بندی شده‌اند (Meyers *et al.*, 1999). آرایش خوشه‌ای این ژن‌ها ممکن است یک مشخصه حیاتی باشد

وسیله الگوریتم Neighbor-Joining، RGAهای جداسازی شده را به دو گروه منتسب کرد. در این گروه بندی، TIR NL25، contig2 و TIR NL27 در گروه دو با جایگزینی‌های نوکلئوتیدی کم قرار گرفتند. همچنین، تمامی نشانگرهای موجود در contig2 به استثنای نشانگرهای 3RA3 و 3RR6 به جایگاه‌های RH11.1 و SH11.1 که جایگاه ژن‌های NL25 و NL27 هستند، منتسب شدند. بنابراین، احتمال دارد نشانگرهای موجود در contig2 به استثنای نشانگرهای 3RA3 و 3RR6 بخشی از ژن‌های NL25 و NL27 یا آلل آن‌ها باشند. در گروه یک، برخی contigها در مقایسه طول انشعابات کوتاه‌تر و در نتیجه سطح تنوع توالی پایین‌تری نسبت به دیگر contigها داشتند (شکل ۳).

۱۶۰ نشانگر RGA در حال تفرق در نقشه ژنتیکی UHD سب‌زمینی متشکل از تقریباً ۱۰۰۰۰ نشانگر AFLP با فاصله متوسط یک جایگاه مکان‌یابی شدند. لازم به ذکر است به علت وجود تعداد زیاد نشانگر در جایگاه‌های RH11.1 و SH11.1 مکان‌یابی نشانگرها با فاصله متوسط یک جایگاه امکان‌پذیر شد. با



شکل ۳- روابط فیلوژنی بین توالی‌های نشانگرهای TIR براساس سطح نوکلئوتیدی. Contigها به وسیله برنامه SeqMan نرم‌افزار DNASTAR به دست آمدند. توالی‌های نوکلئوتیدی دامنه TIR دو ژن NL27 و NL25 در تجزیه وارد شد. روابط فیلوژنتی براساس برنامه MegAlign نرم‌افزار DNASTAR با استفاده از روش Neighbor-joining به دست آمد و توالی‌های منفرد حذف شدند. درصد دقت در آنالیز Bootstrap برای ۱۰۰۰ چرخه در هر نقطه از خوشه‌بندی نشان داده شده است.

Fig. 3. Phylogenetic relationships among sequences of TIR markers at nucleotide level. Contigs derived from SeqMan program of DNASTAR software. Nucleotide sequences of TIR domain of NL25 and NL27 genes entered in the analysis. Phylogenetic relationships were derived by MegAlign program of DNASTAR software based on Neighbor-joining method and single sequences were deleted. Percent of accuracy in bootstrap analysis for 1000 cycles are indicated at each branch point.

Y سیب‌زمینی) و *Rmc1* (ژن مقاومت به *M. chitwodii* در جایگاه متراکم ژن‌های مقاومت در ابتدای کروموزوم ۱۱ مکان‌یابی شده بودند (Simko *et al.*, 2007) اما RGAهای شناسایی شده در این پژوهش در جایگاه‌های RH11.1 و SH11.1 با این ژن‌ها همولوژی نشان ندادند. بروگمنز و همکاران (Brugmans *et al.*, 2008) با استفاده از جمعیت حاضر، در جایگاه‌های RH1.1 و

که تولید ژن‌های مقاومت اختصاصی را به وسیله نو ترکیبی یا تغییر ژن‌ها سبب می‌شود (Hulbert *et al.*, 2001). در این تحقیق خوشه‌های ژنی در جایگاه‌های RH11.1 و SH11.1 واقع در ابتدای کروموزوم ۱۱ شناسایی شدند. در این قسمت از کروموزوم ۱۱ قبلاً جایگاه‌های *Sen1* (ژن مقاومت به *S. endobioticum*)، *Gpa3* (ژن مقاومت به *G. pallid*)، *RYsto* (ژن مقاومت به ویروس

در مکان‌یابی ژن‌های مقاومت منفرد و مکان‌های کمی مقاومت به بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

برخی از توالی‌های RGA دارای رمزهای پایان هستند که امکان دارد این رمزهای پایان از حذف‌ها یا اضافه‌شدن‌های نوکلئوتیدی یا جایگزینی‌های نوکلئوتیدی منتج شده و یا ناشی از اشتباه در توالی‌یابی باشند. به اعتقاد فلیگر و همکاران (Pflieger *et al.*, 1999) اگر این توالی‌ها رمزهای پایان حقیقی باشند، احتمالاً با ژن‌های غیرفعال که شبه‌ژن نامیده می‌شوند منطبق هستند و احتمال انطباق آن‌ها با QRL‌ها کمتر است. جداسازی شبه‌ژن در سویا نیز گزارش شده است (Kanazin *et al.*, 1996). برخی از محققین عنوان می‌کنند که شبه‌ژن‌هایی که در آن‌ها جهش‌های بیشتری در مقایسه با ژن‌های فعال تجمع می‌یابد، منبع اصلی چندشکلی بین ژنوتیپ‌ها هستند. بنابراین، شبه‌ژن‌ها اغلب نزدیک ژن‌های مقاومت مکان‌یابی می‌شوند و نشانگرهای ثابت را تشکیل می‌دهند (Pflieger *et al.*, 1999).

تفاوت‌های واضحی در همولوژی و ارزش E (E value) در همردیفی نمونه‌های بانک ژن با RGA‌های سیب‌زمینی در سطح نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای وجود داشت. چنانکه انتظار می‌رفت جستجو و مقایسه در سطح پروتئینی همولوژی بیشتری با ناحیه TIR بسیاری از RGA‌ها در مقایسه با سطح داشت که علت آن هرز بودن (Degeneracy)

RH4.1 این پژوهش نشانگرهای همولوگ با ژن‌های مقاومت شناخته شده یا RGA‌ها را گزارش کردند. آن‌ها همچنین در نزدیک جایگاه RH5.1 در فاصله ۲۰-۲۳ نیز نشانگر همولوگ با *R1* شناسایی کردند. لازم به ذکر است که وجود خوشه‌های ژنی در نواحی RH4.1 و RH5.1 این پژوهش توسط دیگر محققین (Simko *et al.*, 2007) نیز ثابت شده است. در جایگاه RH7.1 این مطالعه در فاصله ۶۸-۷۱، چهار نشانگر همولوگ با ژن‌های مقاومت شناخته شده توسط دیگر محققین (مذاکرات شفاهی با Jack Vossen) مکان‌یابی شده بود. همچنین در فاصله ۶۸-۶۹ کروموزوم هفت، نشانگر *stm1003* (مذاکرات شفاهی با Jack Vossen) پیوسته با ژن‌های مقاومت گزارش شده است. بنابراین، در این جایگاه‌های ژنی خوشه‌ها و زیرخوشه‌های ژن‌های مقاومت TIR-NBS-LRR وجود دارد. در مطالعه حاضر، جایگاه‌های RH11.2 و RH11.3 نیز در نواحی کروموزومی مترام از ژن‌های مقاومت (Simko *et al.*, 2007) مکان‌یابی شدند. جایگاه SH6.1 در ناحیه همولوگ با خوشه ژنی *Mi* و ژن *Rpi-blb2* (Leister *et al.*, 1996) قرار داشت. همچنین، در جایگاه‌های SH1.1، RH6.2، SH1.2، SH1.3، SH6.3، SH7.1، SH9.1 و SH9.2 زیرخوشه‌هایی از چند نشانگر همولوگ با ژن‌های مقاومت شناخته شده یا RGA‌ها شناسایی شد. نتایج حاصل می‌تواند اسیدنوکلئیک برای یک ناحیه یکسان

سپاسگزاری

این پژوهش به‌وسیله موسسه تحقیقات بین‌المللی گیاهی و گروه اصلاح نباتات بخش مقاومت دانشگاه واگنینگن هلند حمایت شده است. نگارندگان صمیمانه از همکاری اشخاص حقیقی و حقوقی موسسه تحقیقات بین‌المللی گیاهی و گروه اصلاح نباتات بخش مقاومت دانشگاه واگنینگن هلند در پیشبرد این پژوهش قدردانی می‌نمایند.

رمز ژنتیکی است، بنابراین مقایسه در سطح اسیدآمین به نسبت به نوکلئوتید با نوکلئوتید برای برقراری هم‌ردیفی RGAها منطقی‌تر است. علاوه بر این، توالی‌های اسیدآمین به احتمال زیاد در اطراف موتیف‌های ساختاری حفاظت شده‌اند. اطلاعات مربوط به دامنه‌های اسیدآمین حفاظت‌شده، برای جداسازی توالی‌های دارای همولوژی با ژن‌های مقاومت و RGAها استفاده شده است.

References

- Ahn, J. W., Atwell, B.J., and Roberts, T. H. 2009.** Serpin genes AtSRP2 and AtSRP3 are required for normal growth sensitivity to a DNA alkylating agent in Arabidopsis. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/9/52>.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. 1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389–3402.
- Brugmans, B., Wouters, D., van Os, H., Hutten, R., van der Linden, G., Visser, R.G.F., van Eck, H.J., and van der Vossen, E.A.G. 2008.** Genetic mapping and transcription analyses of resistance gene loci in potato using NBS profiling. *Theoretical Applied Genetics* 117: 1379–1388.
- Calenge, F., van der Linden, C. G., van de Weg, E., Schouten, H. J., van Arkel, G., Denancé, C., and Durel, C. E. 2005.** Resistance gene analogues identified through the NBS profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 660–668.
- Dangl, J. L. 1995.** Piece de resistance: Novel classes of plant disease resistance genes. *Cell* 80: 363–366.
- Fulton, T. M., Chunwongse, J., and Tanksley, S. D. 1995.** Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 13: 207–209.
- Gebhardt, C., and Valkonen, J. P. T. 2001.** Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annual Review of Phytopathology* 39: 79–

102.

- Gowda, B. S., Miller, J. L., Rubin, S. S., Sharma, D. R., and Timko, M. P. 2002.** Isolation, sequence analysis, and linkage mapping of resistance-gene analogs in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) *Euphytica* 126: 365–377.
- Gutterson, N., and Reuber, T. L. 2004.** Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 465-471.
- Hammond-Kosack, K. E., and Jones, J. D. 1997.** Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 575-607.
- Hulbert, S. H., Webb, C. A., Smith, S. M., and Sun, Q. 2001.** Resistance gene complexes: Evolution and utilization. *Annual Review of Phytopathology* 39: 285-312.
- Isidore, E., van Os, H., Andrzejewski, S., Bakker, J., Barrena, I., Bryan, G. J., Buntjer, J., Caromel, B., van Eck, H. J., Ghareeb, B., De Jong, W., van Koert, P., Lefebvre, V., Milbourne, D., Ritter, E., Rouppe van der Voort, J. N. A. M., Rousselle-Bourgeois, F., van Vliet, J., and Waugh, R. 2003.** Toward a marker-dense meiotic map of the potato genome: Lessons from linkage group I. *Genetics* 165: 2107–2116.
- Kanazin, V., Marek, L. F., and Shoemaker, R. C. 1996.** Resistance gene analogues are conserved and clustered in soybean. *Proceedings of the National. Academy of Science of the United state of America* 93: 11746 – 11750.
- Kuhn, D. N., Heath, M., Wisser, R. J., Meerow, A., Brown, J. S., Lopes, U., and Schnell, R. J. 2003.** Resistance gene homologues in *Theobroma cacao* as useful genetic markers. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 191–202.
- Leister, D., Ballvora, A., Salamini, F., and Gebhardt, C. 1996.** A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genetis Genetics* 14: 421–429.
- Meyers, B. C., Dickerman, A. W., Michelmore, R. W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B. W., and Young, N. D. 1999.** Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant Journal* 20: 317–332.
- Pan, Q., Liu, Y., Budai-Hadrian, O., Sela, M., Carmal-Goren, L., Zamir, D., and Fluhr, R. 2000.** 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.

- Pflieger, S., Lefebvre, V., Caranta, C., Blattes, A., Goffinet, B., and Palloix, A. 1999.** Disease resistance gene analogs as candidates for QTLs involved in pepper-pathogen interactions. *Genome* 42: 1100–1110.
- Roberts, T. H., and Hejgaard, J. 2008.** Serpins in plants and green algae. *Funct. Integrated Genomics* 8: 1-27.
- Roupe van der Voort, J., Wolters, P., Folkertsma, R., Hutten, R., van Zandvoort, P., Vinke, H., Kanyuka, K., Bendahmane, A., Jacobsen, E., Janssen, R., and Bakker, J. 1997.** Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 874–880.
- Simko, I., Jansky, S., Stephenson, S., and Spooner, D. 2007.** Genetics of resistance to pests and disease. pp. 117-147. In: Vreugdenhil, D., Bradshaw, J., Gebhardt, C., Govers, F., Mackerron, D. K. L., Taylor, M. A., Ross, H. A. (eds.). *Potato Biology and Biotechnology Advances and Perspectives*. Elsevier Ltd. The Netherlands.
- Song, W. Y., Pi, L. Y., Bureau, T. E., and Ronald, P. C. 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. *Molecular and General Genetics* 258: 449–456.
- Starks, C. M., Back, K., Chappell, J., and Noel, J. P. 1997.** Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase. *Science* 277: 1815–1820.
- Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S. 2004.** Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *PNAS*. 101(30): 11030–11035.
- van der Hoeven, R. S., Monforte, A. J., Breeden, D., Tanksley, S. D., and Steffens, J. C., 2000.** Genetic control and evolution of sesquiterpene biosynthesis in *Lycopersicon esculentum* and *L. hirsutum*. *The Plant Cell* 12: 2283–2294.
- van der Linden, C. G., Wouters, D., Mihalka, V., Kochieva, E., Smulders, M., and Vosman, B. 2004.** Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. *Theoretical Applied Genetics* 109: 384–393.
- van Os, H., Andrzejewski, S., Bakker, E., Barrena, I., Bryan, G., Caromal, B., Ghareeb, B., Isidore, E., de Jong, W., van Koert, P., Lefebvre, V., Milbourne, D., Ritter, E., Roupe van der Voort, J., Rousselle-Bourgeois, F., van Vliet, J., Waugh, R., Visser, J., and van Eck, H. 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., Brown, D. G., Shmoys, D. B., Durrett, R. T., and Tanksley, S. D. 1999. Selective mapping: A strategy for optimizing the construction of high-density linkage maps. *Genetics* 155: 407–420.

Young, N. D. 2000. The genetic architecture of resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 285-290.

