ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷
صفحه ۲۸۰ - ۲۷۳

مطالعه ژن‌های آنالوگ مقاومت به بیماری متعلق به خانواده NBS-LRR در کولتیوارهای مختلف بادام (*Prunus dulcis*) ایران

Study of resistance gene analoguses related to NBS-LRR family in different almonds cultivars

نرگس ملک برمی[۱]، مریم غایب زمهریر*[۲]، امیر محمد ناجی[۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲- استادیار، آزمایشگاه پروکاریوت شناسی، بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور،تهران، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Zamharir2005@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

بادام با نام علمی *Prunus dulcis* یکی از قدیمی‌ترین درختان میوه است که امروزه یکی از بیشترین تولیدات میوه خشکباری جهان را به خود اختصاص داده است. در حال حاضر استراتژی کارآمد برای کنترل بیماری‌های مختلف استفاده از گیاهان مقاوم می‌باشد. گیاهان مکانیسم‌های مختلفی را برای دفاع در مقابل بیمارگرها به کار می‌برند. این مکانیسم‌ها با ژن‌های مقاومت گیاه (R genes) فعال می‌شوند. در این مطالعه ژن‌های آنالوگ مقاومت متعلق به خانواده NBS-LRR در کولتیوارهای بادام ایران بررسی شدند. به این منظور حدود بیست کولتیوار مختلف بادام موجود در کلکسیون‌های ایران تهیه و DNA آن‌ها با روش CTAB استخراج شد. آغازگرهای دجنریت برای تکثیر ژن‌های آنالوگ مقاومت طراحی شد. در مجموع ۹۰ قطعه چند شکل حاصل شد که قطعات چندشکلی از روی ژل آکریل آمید جداسازی و پس از همسانه‌سازی در وکتورpGEM، توالی یابی شدند. نتایج نشان داد که در آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت خانواده NBS-LRR بین کولتیوارهای مختلف بادام تنوع زیادی وجود دارد. نتایج توالی‌یابی آنالوگ‌های تکثیرشده، نشان داد که ۵۵ درصد آن‌ها با ژن‌های مقاومت شناخته شده یا پروتئین‌های مقاومت به بیماری شباهت داشتند و ٤٥ درصد آن‌ها آنالوگ‌های جدید بوده که تاییدی بر انجام مطالعات جامع‌تر جهت شناسایی منابع مقاومت جدید به بیماری‌ها در کولتیوارهای بادام ایرانی است. توالی‌های شناخته شده عمدتاً با پروتئین‌های مقاومت به نماتد شباهت داشتند. از نظر فیلوژنی توالی آنالوگ ژن‌های مقاومت در کولتیوارهای بادام ایران در هشت شاخه‌ی مجزا قرا گرفتند که از آن‌ها می‌توان در مکان‌یابی ژن‌های مقاومت منفرد و تعیین مکان‌های کمی مقاومت به بیماری‌ها در بادام استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی

بادام
Prunus dulcis
مقاومت به بیماری
NBS-LRR

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-09-14]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.10.9]

مقدمه

بادام (*Prunus dulcis*) یکی از قدیمی‌ترین درختانی است که در مناطق سردسیری و نیمه سردسیری ایران کشت می‌شود. فرض بر این است که خاستگاه اصلی بادام منطقه وسیعی از ایران و تاجیکستان و افغانستان تا غرب پاکستان بوده و از آن‌جا به یونان و بعدها توسط یونانی‌ها به سایر بنادر دریای مدیترانه انتقال و انتشار یافته است. قریب دویست سال است که بادام در نقاط مختلف حوزه مدیترانه از طریق بذر تکثیر شده و در اثر انتخاب طبیعی توده‌های مختلفی از بادام در نقاط مختلف جغرافیایی دنیا به وجود آمده و سازگار شده‌اند (Amirghasemi 2002).

بادام (*P. dulcis*) از قدیمی‌ترین محصولات خشکباری به شمار می‌آید. طبق آمارنامه وزارت کشاورزی، ایران با تولید ۱٤٦٤٥۲/۳ تن بادام در سال ۹۵، حدود ۵ درصد تولید جهانی را دارا است و چهارمین تولید کننده‌ی بزرگ بادام را در بین کشورهای تولید کننده بادام در جهان است (Ahmadi et al. 2017). با توجه به شرایط اقلیمی و دارا بودن انواعی از گونه‌های مهم وحشی و اهلی بادام، ایران، کشور مناسبی برای پرورش و تولید بادام می‌باشد. چندین کولتیوار از بادام بومی درایران که با اسامی مامائی، ربیع (علی اکبر ربیع)، سفید (محبعلی)، منقای اصفهان، کف مال، نجف‌آبادی، سفیدکاغذی ممقان، کاغذی شیرامین، جد مامائی، تاجری، انجیری، دوبهر، شمشیری، پسته ای، سنگ دیزج، شاپوری کرمانی و مقصود لو، آذر، سهند، شکوفه، شاهرود ۱۲شناخته شده است (Amirghasemi 2002).

بادام نیز مانند سایر گیاهان مورد حمله بیمارگرهای زیادی قرار می‌گیرد. در حال حاضر استراتژی کارآمد برای کنترل بیماری‌ها، استفاده از گیاهان مقاوم می‌باشد (Kanazin et al. 1996). انتخاب این گیاهان مقاوم می‌تواند از طریق آزمایشات آلوده سازی گلخانه‌ای و یا استفاده از روش‌های مولکولی مانند نشانگرهای مولکولی می‌باشد. (Zhang et al. 2013; Kump and Javornik 1996). در مورد بعضی بیماری‌ها مانند بیماری فایتوپلاسمایی جاروک بادام و بیماری‌های ویروسی یافتن مقاومت‌های طبیعی نادر است و بیش‌تر تمرکز بر استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی برای تولید گیاهان مقاوم می‌باشد.

مهندسی ژنتیک و اصلاح نباتات در دهه‌های اخیر راهکارهای جدیدی برای معرفی مقاومت به بیمارگرها در گیاهان مختلف فراهم کرده است. ژن‌های مقاومت گیرنده‌هایی را در سلول کد می‌کنند که حضور پاتوژن خاصی را در گیاه ردیابی نموده و این فعل و انفعالات از طریق مسیرهای انتقال سیگنال می‌باشد (Hammond-Kosack and Jones 1996). گروه اصلی ژن‌های مقاومت، ژن‌هایی هستند که پروتئین گروه NBS–LRR را کد می‌کنند. این پروتئین‌ها دارای یک ناحیه اتصال به نوکلئوتید[1] (NBS) و یک ناحیه غنی از لوسین [2](LRR) است. خانواده NBS–LRR بر اساس ناحیه انتهایی N پروتئین کد کننده به دو گروه TIR–NBS–LRR و non-TIR–NBS–LRR تقسیم می‌شوند (Zhang et al. 2013). گروه ژن‌های مقاومت TIR–NBS–LRR که ناحیه انتهایی N پروتئین کدکننده آن با پروتئین toll سیتوپلاسم دروزوفیلا (*Drosophila sp.*) و گیرنده interleukin-1 در پستانداران شبیه است و گروه دوم ژن‌های مقاومت non-TIR–NBS–LRR هستند که ساختمان به هم پیچیده دارند (Khan 2009). مطالعه توالی‌های ژن‌های مقاومت مختلف از گونه‌های گیاهی متنوع نشان می‌دهد، اگر چه این توالی‌ها همولوژی زیادی ندارند، اما بخش‌های از دامنه‌های آن‌ها حفاظت شده می‌باشد که این امکان را فراهم آورده است که آغازگرهای دجنریت (چند حالتی) در ناحیه محافظت شده NBS ساختمان آنها برای تکثیر از طریق PCR طراحی شود (Hulbert et al. 2001) و ژن‌های شبه مقاومت در گیاهانی که هنوز مقاومت در آن‌ها شناسایی نشده‌است را مطالعه کرد. این ژن‌های مقاومت در گیاهان علی رغم ساختارهای متنوع، دارای عملکرد یکسان بوده و به نام آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت در گیاهان نامیده می‌شوند (Leister et al. 1996; Kozjak et al. 2009) است

شناسایی آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت در گونه‌های مختلف گیاهی مانند، سویا، لوبیا، یونجه، قهوه، کاهو، انگور (Yaish et al. 2004) و گوجه سبز انجام شده‌است (Lalli et al. 2005). بر اساس دانش ما، تا کنون ای اس تی [3](EST) در کولتیوارهای بادام ایران که

[1] nucleotide-binding site
[2] leucine-rich domain
[3] Expressed sequenc tags

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-09-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.10.9]

متعلق به ژن‌های پروتئینی مقاومت به بیماری باشند گزارش نشده‌است. از آنجایی‌که ژنوم بادام نیز به‌طور کامل تعیین توالی نشده است، آسان‌ترین و سریع‌ترین راه برای دست‌یابی به این ژن‌ها استفاده از آغازگرهای دجنریت در ناحیه محافظت شده NBS می‌باشد. در این مطالعه ژن‌های آنالوگ مقاومت –NBS LRR در کولتیوارهای مختلف بادام ایران به این روش مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی ۲۱ کولتیوار بادام به‌منظور ارزیابی ژن‌های آنالوگ مقاومت به بیماری، از کلکسیون بادام واقع در پژوهشکده بیوتکنولوژی اصفهان و کرج تهیه شد که شامل کولتیوارهای محب علی، مامائی، کاغذی نجف‌آبادی، شاهرود۱۲، آذر، سهند، سنگی تبریز، زود گل ده شیراز، سنگی ارومیه، دیرگل تبریز هستند که اطلاعات آن در جدول ۲ ارایه شده‌است. DNA لازم از برگ این نهال‌ها به روش CTAB با تغییراتی (Doyle and Doyle 1990; Doyle 1990) استخراج شدند.

در این مطالعه از آغازگرهای دجنریت که از روی موتیف‌های ژن‌های کدکننده پروتئین NBS–LRR طراحی شده بودند استفاده شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از این آغازگرها به روش Kozjak et al. (2009) انجام شد (جدول ۱). بهترین دما برای تکثیر قطعاتی از ژنوم بادام ایران با استفاده از آغازگرهای دجنریت که از روی موتیف‌های ژن‌های کد کننده پروتئین –NBS LRR طراحی شده بودند در یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز گرادیانت تعیین شد و فرآورده‌های حاصل از این واکنش در ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد بررسی شد. سپس DNA حاصل از نمونه‌های استخراج شده با استفاده از ترکیب‌های آغازگری مختلف (جدول ۱) در یک واکنش زنجیره‌ای پلی مراز تکثیر شدند. بهترین ترکیب آغازگری که بتواند در همه کولتیوارهای بادام ایرانی طویل ترین قطعه را تکثیر کند، برای مراحل بعد انتخاب و در آنالیزهای بعدی استفاده شد.

ترکیب آغازگری NBSF1/R1 در مرحله قبل به‌عنوان بهترین ترکیب آغازگری برای مطالعه ژن‌های آنالوگ مقاومت خانواده NBS-LRR در کولتیوارهای بادام ایران انتخاب شد. به‌منظور تکثیر ژن‌های آنالوگ مقاومت به بیماری‌ها در خانواده -NBS LRR در کولتیوارهای بادام ایران با جفت آغازگرهای NBSF1/R1، واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۲–۱ میکرو لیترDNA، ۲۰۰ میکرومولdNTP ، ۲۰۰ میکرولیتر از هر آغازگرپیشرو و پیرو، ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰X) ، ٤ میلی‌مولار $MgCl_2$، یک واحد آنزیم Taq پلیمراز (سیناژن ،ایران) و آب دو بار تقطیر شده استریل صورت گرفت. تیوب‌ها در دستگاه PCR قرار داده شده و ۳۵ چرخه دمایی شامل یک دقیقه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد برای واسرشتگی DNA (اولین چرخه ۵ دقیقه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد)، ۱ دقیقه در ٤۸ درجه سانتی‌گراد برای اتصال آغازگر، ۱/۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ساختن DNA انجام گرفت.

جدول ۱– توالی وترکیب آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه ژن‌های آنالوگ مقاومت در کولتیوارهای بادام ایران

ترکیب آغازگری	نوع آغازگر	توالی	منبع
NBSF1/R1	پشرو (NBSF1)	5´- GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC-3´	Yu et al. (1996)
	پیرو (R1)	5´-YCTAGTTGTRAYDATDAYYYTRC-3´	Yu et al. (1996)
P/K2	پشرو (P)	5´-CCAIACATCATCMAGSACAA-3´	Kozjak et al. (2009)
	پیرو (K2)	5´-GGIGGIRTIGGIAAIACIAC-3´	Kozjak et al. (2009)
P/K2R	پشرو (P)	5´-CCAIACATCATCMAGSACAA-3´	Kozjak et al. (2009)
	پیرو (K2R)	5´- 3´	Kozjak et al. (2009)
P/K2RT	پشرو (P)	5´-CCAIACATCATCMAGSACAA-3´	Kozjak et al. (2009)
	پیرو (K2RT)	5´-ATCIACATCATCNAGMACRA-3´	Kozjak et al. (2009)
LM637/ LM638	پشرو (LM637)	5´- ARIGCTARIGGIARICC-3´	Kanzine et al. (1996)
	پیرو (LM638)	5´- GGIGGIGTIGGIAAIACIAC-3´	Kanzine et al. (1996)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-09-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.10.9]

پس به‌منظور توسعه طول رشته DNA به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه باقی خواهد ماند. محصول PCR در آگارز ۱/۲ درصد،ولتاژ۸۰، به مدت ٤٥ دقیقه و رنگ‌آمیزی اتیدیوم برماید، الکتروفورز شده و با اشعه UV از باندهای حاصل عکسبرداری شد.

همسانه سازی نمونه‌های بازیافت شده ازروی ژل پلی آکریل آمید با استفاده از ناقل pGEM cloneJet system، محصول شرکت پرومگا (آمریکا) انجام شد. به این منظور ۳ میکرولیتر از فرآورده‌های حاصل از تکثیر PCR با آغازگر NBSF1/R1، با ۵ واحد آنزیم T4 DNA ligase به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق (دمای۲۵ درجه سانتی‌گراد) در بافر الحاق و ۵۰ نانوگرم ناقل پلاسمیدی pGEM، صورت گرفت. این الحاق‌ها به *Escherichia coli* نژاد XL1 انتقال داده شدند.

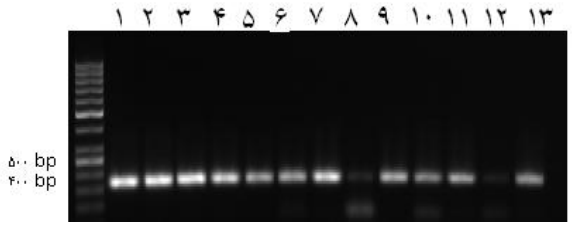
برای جداسازی و خالص کردن پلاسمیدها، باکتری‌های رشد کرده در محیط کشت LB محتوی ۵۰ g/l آمپی سیلین رشد کردند و از این باکتری‌ها پلاسمید استخراج شد (Borges et al. 2003). پس از حل کردن پلیت پلاسمید در ٤٠ میکرولیتر آب، به هر نمونه پلاسمید، ۱۰واحد آنزیم RNase-A اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا RNA نمونه‌ها حذف شود. کیفیت استخراج پلاسمید با الکتروفورز کردن ۵ µl پلاسمید در ژل آگارز (w/v) یک درصد تعیین شد. طول قطعه جایگزین بعد از هضم ۱۰ میکرولیتر از پلاسمید استخراج شده با ۵ واحد آنزیم *Eco*RI در واکنش هضمی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و الکتروفورز در ژل آگارز (w/v) دو درصد تخمین زده شد.

بیست و دو قطعه از قطعات جداسازی شده تعیین توالی شدند. همولوژی بین کلونی‌های تهیه شده و توالی‌های ژن‌های مقاومت به بیمارگر خانواده NBS_LRR موجود در بانک ژن (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) با BLASTN و BLASTX algorithms (Altschul et al. 1990) و با BLASTN در بانک ژن آرابیدوپسیس (http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/Blast/TAIRblast.pl)تعیین شد. سپس توالی‌های به‌دست آمده از بررسی کولتیوارهای بادام ایرانی با توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از نرم افزار ClustalX هم‌ردیف شده و درخت فیلوژنی آن‌ها ترسیم شد (Thompson et al. 1997). صحت گره‌های درخت نیز با بوت استرپ ۱۰۰۰ بررسی شد (Tamura et al. 2007; Felsenstein 1985).

نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی اولیه آغازگرها (جدول ۱) با استفاده از DNA استخراج شده از کولتیوار محب علی روی ژل آکریل آمید نشان داد که این آغازگرها قادر به تکثیر قطعاتی از موتیف‌های ژن‌های کد کننده پروتئین NBS–LRR هستند و ترکیب‌های آغازگر PK2r، Fnbs/Rnbs و PK2rT قادر به تکثیر ژن‌های آنالوگ مقاومت به بیمارگر در کولتیوارهای مختلف بادام می‌باشند. نتایج بررسی با آغازگرهای مختلف تولید ۹۰ قطعه همشکل کرد. آغازگر LM637/LM638 قادر به تکثیر آنالوگ‌های مختلف مقاومت به بیمارگر در بادام نبود.

بررسی فرآورده‌های حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از ترکیب آغازگری NBSF1/R1 بر روی ۲۱ کولتیوار بادام در این مطالعه نشان داد که ترکیب آغازگری NBSF1/R1 می‌تواند کولتیوارهای مختلف بادام را از نظر تنوع ژن‌های آنالوگ مقاومت به بیمارگر تفکیک نماید (شکل۱). نتایج آنالیز بلاست قطعات جداسازی شده در جدول (۲) آمده است. نتایج هم‌ردیفی قطعات حاصل از این مطالعه با سایر ژن‌های مقاومت به بیمارگر جداشده از هسته‌داران نشان دهنده تنوع بالای این آنالوگ‌ها بود. تجزیه فیلوژنی تعدادی از NBS نشان می‌دهد که کولتیوارهای مختلف جنس بادام در ۸ گروه اصلی قرار دارند (شکل ۲).



شکل ۱- نتایج شناسایی ژن‌های آنالوگ مقاومت به بیمارگر در کولتیوارهای مختلف بادام با استفاده از ترکیب آغازگر NBSF1/R1. چاهک‌ها به‌ترتیب از چپ به راست (DNA Size marker 1KB (fermantase، ۱- ۱۳ مربوط به کولتیوارهای محب‌علی، مامایی ۲، زود گل‌ده شیراز، سهند، آذر، شاهرود ۱۲، دیرگلده تبریز، سنگی ارومیه، نجف‌آبادی، کاغذی نجف‌آباد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-09-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.10.9]

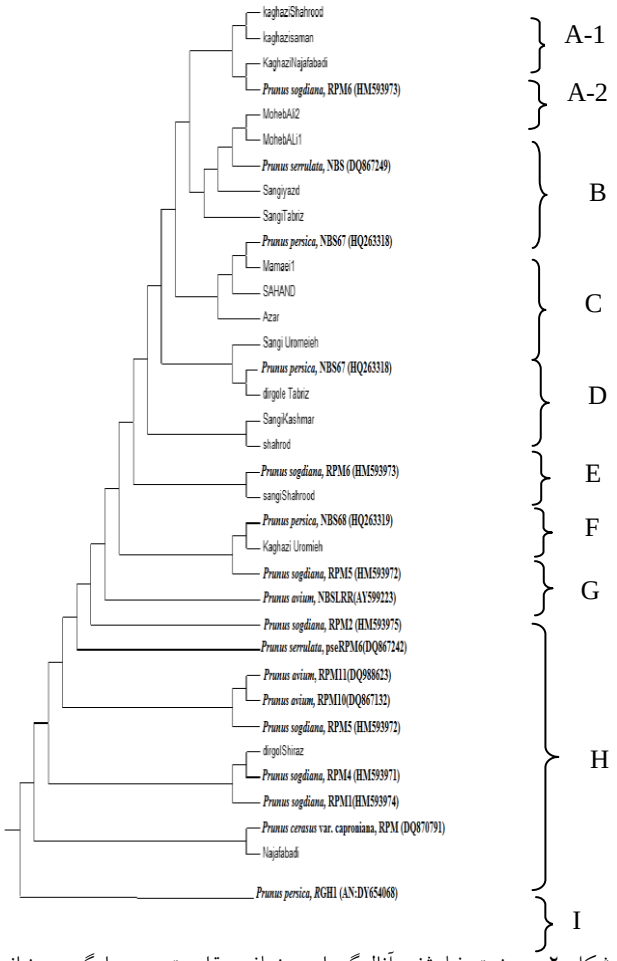
جدول ۲- نتایج بلاست تعدادی از توالی‌های ژن‌های آنالوگ مقاومت به بیمارگر در کولتیوارهای بادام ایران

رقم	محل جمع آوری	Annotation (plant, accession number)	Evalue	%homology
محب علی ۱	کلکسیون بیوتکنولوژی اصفهان	*Prunus persica* hypothetical protein (PRUPE_ppa024644mg) mRNA,XM_007199281.1	3e-09	۸۲
مامایی ۱	کلکسیون بیوتکنولوژی اصفهان	gi|328909926|gb|HQ263321.1| *Prunus persica* clone NBS72 NBS resistance protein gene, partial cds	3e-04	۸۵
مامایی ۲	کلکسیون بیوتکنولوژی اصفهان	gi|328909926|gb|HQ263321.1| *Prunus persica* clone NBS72 NBS resistance protein gene, partial cds	7e-04	۸۹
دیرگل‌ده شیراز	کلکسیون بیوتکنولوژی کرج	gi|310893448|gb|HM593971.1| *Prunus sogdiana* NBS-containing resistance-like protein (RPM4) gene,	6e-1	۸۹
سهند	کلکسیون بیوتکنولوژی کرج	gi|328909926|gb|HQ263321.1| *Prunus persica* clone NBS72 NBS resistance protein gene, partial cds	3e-09	۸۸
آذر	کلکسیون بیوتکنولوژی کرج	gi|328909926|gb|HQ263321.1| *Prunus persica* clone NBS72 NBS resistance protein gene, partial cds	1e-2	۷۹
شاهرود ۱۲	کلکسیون بیوتکنولوژی کرج	gi|328909923|gb|HQ263319.1| *Prunus persica* clone NBS68 NBS resistance protein gene, partial cds	9e-1	۹۱
دیرگلده تبریز	کلکسیون بیوتکنولوژی کرج	gi|328909921|gb|HQ263318.1| *Prunus persica* clone NBS67 NBS resistance protein gene, partial cds	1e-2	۷۸
سنگی ارومیه	کلکسیون بیوتکنولوژی کرج	gi|328909926|gb|HQ263321.1| *Prunus persica* clone NBS67 NBS resistance protein gene, partial cds	3e-2	۸۱
نجف آبادی ۱	کلکسیون بیوتکنولوژی اصفهان	*Prunus persica* hypothetical protein (PRUPE_ppa024644mg) mRNA, XM_007199281.1	5e-20	۸۲
نجف آبادی ۲	کلکسیون بیوتکنولوژی اصفهان	*Prunus mume* disease resistance protein RPM1-like (LOC103342710), mRNA, XM_008246350.	4e-01	۸۸
کاغذی نجف آباد ۱	کلکسیون بیوتکنولوژی اصفهان	gi|310893414|gb|HM593973.1| *Prunus sogdiana* NBS-containing resistance-like protein (RPM6) gene,	6e-2	۸۹
کاغذی نجف آباد ۲	کلکسیون بیوتکنولوژی اصفهان	gi|310893414|gb|HM593973.1| *Prunus sogdiana* NBS-containing resistance-like protein (RPM6) gene,	2e-01	۷۹

درخت به‌دست آمده با میانگین طول شاخه= ۷/۷۷۹۶۶۷ می‌باشد. طول شاخه با فاصله تکاملی آنالوگ‌های مختلف مقاومت به بیمارگر خانواده NBS-LRR در کولتیواهای مختلف بادام ایرانی متناسب است. فاصله تکاملی به روش ماکزیمم تشابه (Maximum Composite Likelihood) محاسبه شده‌است که بر اساس تعداد بازهای جایگزین شده در هر محل می‌باشد. این آنالیزها با استفاده از توالی‌های حاصل از این مطالعه و آنالوگ‌های مقاومت به بیمارگر به سایر گونه‌های جنس پرونوس ترسیم شده است.

تجزیه فیلوژنی آنالوگ‌های شناسایی شده در این مطالعه مشخص می‌کند که کولتیوارهای کاغذی شاهرود، کاغذی سمنان، سنگی یزد و سنگی شاهرود شباهتی با هیچیک از آنالوگ‌های خانواده NBS-LRR ندارند. کولتیوار دیر گل فارس و نجف آبادی در فاصله فیلوژنتیکی زیاد از سایر آنالوگ‌های مقاومت به بیمارگر در خانواده NBS-LRR در کولتیوارهای بادام ایران قرار گرفته است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-09-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.10.9]



شکل ۲- درخت فیلوژنی آنالوگ‌های مختلف مقاومت به بیمارگر در خانواده NBS-LRR در کولتیوارهای مختلف بادام به روش Neighbor-Joining با نرم‌افزار Mega6. آنالوگ‌های خانواده NBS-LRR در کولتیوارهای ایرانی با قلم ساده و آنالوگ‌های خانواده NBS-LRR درکولتیوارهای استخراج شده از بانک ژن با قلم ضخیم مشخص شده‌است.

تجزیه فیلوژنی آنالوگ‌های شناسایی شده در این مطالعه مشخص می‌کند که کولتیوارهای کاغذی شاهرود، کاغذی سمنان، سنگی یزد و سنگی شاهرود شباهتی با هیچیک از آنالوگ‌های خانواده NBS-LRR ندارند. کولتیوار دیر گل فارس و نجف‌آبادی در فاصله فیلوژنتیکی زیاد از سایر آنالوگ‌های مقاومت به بیمارگر در خانواده NBS-LRR در کولتیوارهای بادام ایران قرار گرفته است. مطالعات مربوط به ماکسیمم فاصله دوتایی نشان داد که روی پروتئین‌های متعلق به خانواده NBS- LRR در کولتیوارهای بادام کاغذی ایران تغییرات کمی اتفاق افتاده است که قرابت آن‌ها را به هم زیاد می‌کند و باعث ایجاد پروتئین‌های جدید متعلق به خانواده NBS-LRR در کولتیوارهای بادام کاغذی ایران شده است. با توجه به نتایج بلاست (جدول۲) و تجزیه فیلوژنی (شکل۲) آنالوگ‌های شناسایی شده در کولتیوارهای بادام به شرح زیر می‌باشند:

کولتیوار کاغذی نجف‌آباد (گروه A2) در بررسی‌های همولوژی (بلاست) (جدول ۲) و فیلوژنی با پروتئین مقاومتی PRM6 جداسازی شده از *Prunus sogdiana* در یک گروه قرار گرفته‌اند. پروتئین مقاومتی PRM6، در مقاومت به نماتد مولد گره ریشه در Myrobalan plum (*Prunus sogdiana*) نقش دارد (Fang-quan et al. 2010). تاکنون مطالعه‌ای بر روی مقاومت به بیمارگر کولتیوارهای مختلف بادام به‌خصوص کولتیوار کاغذی و یا هسته‌دار به نماتد مولد گره ریشه در ایران انجام نشده است. در یک مطالعه نشان داده شده‌است اثر متقابل بین پیوندک پررشد مامایی و پایه‌های هیبرید محلی هلو × بادام شورابی۱ و ۲ باعث تحمل خسارت ناشی از حمله نماتد شد (Samani and Fadaei 2015). لذا بادام کاغذی نجف‌آبادی می‌تواند به‌عنوان یک منبع مقاومت به این نماتد مورد ارزیابی تکمیلی قرار گیرد.

کولتیوارهای محب علی، سنگی یزد و سنگی شاهرود همراه با یک پروتئین مقاومتی متعلق به خانواده NBS-LRR از *Prunus serrulata* در گروه B قرار گرفتند. در بررسی‌های همولوژی (جدول ۲) کولتیوار محب علی با پروتئین مقاومتی متعلق به خانواده NBS-LRR از *Prunus persica* شباهت دارد، ولی کولتیوارهای سنگی یزد و سنگی شاهرود با هیچیک از آنالوگ‌های خانواده NBS-LRR شباهتی نداشتند (جدول ۲). هرچند کولتیوارهای سنگی یزد و سنگی شاهرود در شاخه‌های مجزا در نزدیک‌ترین فاصله با پروتئین مقاومتی متعلق به خانواده NBS-LRR از *Prunus persica* قرار گرفته‌اند، ولی در تجزیه فیلوژنی این سه کولتیوار در یک گروه قرار گرفته و قرابت نزدیکی با هم نشان می‌دهند. پروتئین مقاومتی متعلق به خانواده NBS-LRR از *Prunus persica* این گروه کاندید مناسبی برای مطالعات آتی ارزیابی مقاومت بادام مقابل بیماری‌های گیاهی می باشد.

کولتیوارهای مامایی، سهند و آذر گروه C را تشکیل می‌دهند. در بررسی‌های همولوژی (بلاست) آنالوگ‌های مقاومت در این کولتیوارها با پروتئین مقاومتی NBS72 جداسازی شده از هلو *Prunus persica* شباهت دارند (جدول ۲). در تجزیه فیلوژنی نیز

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-09-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.10.9]

این پروتئین‌ها در یک گروه قرار گرفته و قرابت نزدیکی با هم نشان می‌دهند به گونه‌ای که کولتیوار سهند و مامایی تشکیل گروه‌های خواهری داده‌اند و کولتیوار آذر در نزدیک‌ترین فاصله از دو کولتیوار دیگر قرار گرفته است. پروتئین مقاومتی NBS72، از آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت از هلوی وحشی *Prunus kansuensis* کلون شده‌است و نشانگری برای مقاومت در برابر نماتد مولد گره ریشه است (Cao et al. 2011).

کولتیوار سنگی ارومیه، دیرگل تبریز و پروتئین مقاومتی NBS67 جداسازی شده از هلو *Prunus persica* اعضای گروه D را تشکیل می‌دهند. مطالعات بلاست نشان می‌دهد که آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت در کولتیوار سنگی ارومیه، دیرگل تبریز با آنالوگ‌های شناخته شده در هلو همولوژی دارد (جدول ۲). تجزیه فیلوژنی نیز این دو کولتیوار را در کنار هم و منشعب از پروتئین مقاومتی NBS67 در هلو قرار می‌دهد. پروتئین مقاومتی NBS67 از آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت در هلوی وحشی *Prunus kansuensis* است و نشانگری برای مقاومت در برابر نماتد مولد گره ریشه است (Cao et al. 2011).

کولتیوار سنگی شاهرود که تنها کولتیوار بادام عضو گروه F است، در بررسی‌های همولوژی (بلاست) و در تجزیه فیلوژنی با پروتئین مقاومتی PRM4 جداسازی شده از *Prunus sogdiana* شباهت دارد. پروتئین مقاومتی PRM4 در مقاومت به نماتد مولد گره ریشه در (*Prunus sogdiana*) Myrobalan plum نقش دارد (Fang-quan et al. 2010). لذا بادام سنگی شاهرود می‌تواند به‌عنوان یک منبع مقاومت به این نماتد مورد ارزیابی تکمیلی قرار گیرد.

کولتیوار کاغذی ارومیه در گروه G قرار دارد و در شاخه مستقلی از سایر آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت خانواده NBS-LRR و کولتیوارهای کاغذی ایران قرار گرفته است. در تجزیه فیلوژنی این کولتیوار با پروتئین مقاومتی NBS68 جداسازی شده از هلو *Prunus persica* در یک گروه قرار گرفته‌اند و با پروتئین مقاومتی RPM5 جداسازی شده از *Prunus sogdiana* گروه خواهری تشکیل می‌دهند. کولتیوارهای کاغذی شاهرود و کاغذی سمنان در گروه A1 قرار دارند. در بررسی‌های همولوژی (بلاست) با هیچیک از آنالوگ‌های خانواده NBS-LRR شباهتی نداشتند ولی در تجزیه فیلوژنی در یک گروه قرار گرفته و قرابت نزدیکی با هم نشان می‌دهند هم‌چنین با گروه A2تشکیل گروه‌های خواهری می‌دهند. از نظر فیلوژنی نیز گروه A2 با گروه A1، گروه خواهری تشکیل می‌دهند. جمع‌بندی این اطلاعات با اطلاعات مربوط به مطالعات ماکسیمم فاصله دوتایی (جدول ۳) نشان می‌دهد تغییرات کمی روی پروتئین‌های متعلق به خانواده LRR - NBS در کولتیوارهای بادام کاغذی ایران اتفاق افتاده است که قرابت آن‌ها را به هم زیاد می کند و باعث ایجاد پروتئین‌های جدید متعلق به خانواده NBS-LRR در کولتیوارهای بادام کاغذی ایران شده‌است.

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1. RPM																					
2. Prunus																					
3. NBS	0.031																				
4. dirgolShiraz	0.031	0.023																			
5. RPM2	0.039	0.031	0.008																		
6. RPM1	0.031	0.023	0.000	0.008																	
7. RPM11	0.039	0.047	0.039	0.047	0.039																
8. RPM10	0.039	0.047	0.039	0.047	0.039	0.000															
9. RPM25	0.039	0.047	0.039	0.047	0.039	0.000	0.000														
10. pse6PM6	0.000	0.031	0.031	0.039	0.031	0.039	0.039	0.039													
11. RPM4	0.221	0.204	0.218	0.218	0.218	0.174	0.174	0.174	0.221												
12. PRMlike	0.229	0.240	0.238	0.248	0.238	0.196	0.196	0.196	0.229	0.200											
13. NBS68	1.162	1.240	1.161	1.161	1.161	1.068	1.068	1.068	1.162	1.036	0.966										
14. RPM6	0.955	1.052	0.997	0.997	0.997	0.911	0.911	0.911	0.955	0.822	0.846	0.286									
15. RPM5	1.244	1.222	1.245	1.245	1.245	1.207	1.207	1.207	1.244	1.165	1.159	0.992	0.830								
16. Azar	0.888	0.908	0.961	0.961	0.961	0.921	0.921	0.921	0.888	1.052	1.123	1.294	1.163	1.426							
17. sangShahrood	0.924	1.029	0.999	0.999	0.999	1.004	1.004	1.004	0.924	1.182	1.261	1.291	1.145	1.393	0.164						
18. SangKashmar	1.454	1.511	1.493	1.476	1.493	1.488	1.488	1.488	1.454	1.449	1.479	1.560	1.472	1.552	1.558	1.652					
19. shahrod	1.419	1.476	1.458	1.440	1.458	1.453	1.453	1.453	1.419	1.414	1.444	1.507	1.528	1.575	1.521	1.616	0.008				
20. NBS67	1.449	1.449	1.453	1.453	1.453	1.435	1.435	1.435	1.449	1.385	1.449	1.352	1.610	1.408	1.480	1.311	1.732	1.697			
21. NBS64	1.164	1.208	1.239	1.188	1.239	1.176	1.176	1.176	1.164	0.943	0.978	1.349	1.157	1.512	1.462	1.393	1.395	1.340	0.809		
22. kaghaziShahrood	1.061	1.101	1.131	1.111	1.131	1.031	1.031	1.031	1.061	1.454	1.193	1.697	1.679	1.283	1.253	1.378	1.627	1.575	2.031	1.687	
23. kaghaziUromiyeh	1.041	1.061	1.014	0.994	1.014	1.011	1.011	1.011	1.041	1.368	1.053	1.798	1.783	1.383	1.247	1.417	1.613	1.561	2.042	1.622	0.093
24. KaghaziNajafabadi	1.203	1.306	1.254	1.235	1.254	1.173	1.173	1.173	1.203	1.514	1.294	1.817	1.511	1.288	1.372	1.499	1.774	1.726	1.801	1.528	0.253
25. Kaghazisaman	1.150	1.253	1.201	1.181	1.201	1.119	1.119	1.119	1.150	1.463	1.235	1.851	1.520	1.331	1.305	1.480	1.769	1.720	1.848	1.551	0.294
26. MohebAli2	1.185	1.216	1.217	1.217	1.217	1.132	1.132	1.132	1.185	1.350	1.362	1.593	1.293	1.231	1.408	1.613	1.711	1.662	1.754	1.458	0.907
27. MohebAli1	1.185	1.216	1.217	1.217	1.217	1.132	1.132	1.132	1.185	1.350	1.362	1.593	1.293	1.231	1.408	1.613	1.711	1.662	1.754	1.458	0.907
28. Najafabadi	1.185	1.216	1.217	1.217	1.217	1.132	1.132	1.132	1.185	1.350	1.362	1.593	1.293	1.231	1.408	1.613	1.711	1.662	1.754	1.458	0.907
29. Sangiyasd	1.173	1.204	1.205	1.205	1.205	1.121	1.121	1.121	1.173	1.337	1.349	1.721	1.430	1.231	1.453	1.658	1.640	1.590	1.683	1.412	0.787
30. SangTabriz	1.173	1.204	1.205	1.205	1.205	1.121	1.121	1.121	1.173	1.337	1.349	1.721	1.430	1.231	1.453	1.658	1.640	1.590	1.683	1.412	0.787
31. sahand	1.320	1.390	1.336	1.336	1.336	1.288	1.288	1.288	1.320	1.387	1.337	1.305	1.229	1.214	1.164	1.111	1.772	1.722	1.549	1.657	1.049
32. Mamani	1.320	1.390	1.336	1.336	1.336	1.288	1.288	1.288	1.320	1.387	1.337	1.305	1.229	1.214	1.164	1.111	1.772	1.722	1.549	1.657	1.049
33. RGrf1	1.374	1.407	1.430	1.430	1.430	1.360	1.360	1.360	1.374	1.422	1.449	1.353	1.256	1.242	1.231	1.110	1.759	1.781	1.519	1.469	1.298
34. NBS72	1.404	1.463	1.389	1.389	1.389	1.279	1.279	1.279	1.404	1.125	1.336	0.946	1.020	1.557	0.965	1.106	1.685	1.649	1.449	1.551	1.774
35. rps2	0.951	0.962	0.958	0.958	0.958	1.034	1.034	1.034	0.951	1.171	1.318	1.568	1.533	1.434	1.257	1.358	1.427	1.374	1.616	1.794	1.517

جدول ۳- محاسبات ماکسیمم فاصله دوتایی آنالوگ ژن‌های مقاومت به بیمارگر به‌منظور تخمین میانگین تغییرات حادث شده برای تمایز آنالوگ‌های خانواده NBS-LRR در کولتیوارهای مختلف بادام ایران.

کولتیوار دیرگل فارس به همراه آنالوگ‌هایی از ژن‌های مقاومت خانواده NBS-LRR گونه *Prunus sogdiana* قرار گرفته‌اند. آنالوگ‌های مقاومت در این کولتیوار از سایر اعضای خانواده در کولتیوارهای ایران مجزا شده‌است و در کنار آنالوگ‌های مقاومت RPM1 و RPM4 در هلو در فاصله فیلوژنتیکی زیاد از سایر آنالوگ‌های مقاومت خانواده NBS-LRR در کولتیوارهای بادام ایران قرار گرفته است.

آنالیزهای پروتئینی با نرم‌افزار Mega6 برای محاسبات ماکسیمم فاصله دوتایی آنالوگ ژن‌های مقاومت به‌منظور تخمین میانگین تغییراتی که اتفاق افتاده است تا دو پروتئین متعلق به خانواده NBS_LRR در کولتیوارهای مختلف بادام ایران از یکدیگر متمایز شوند، ضمن تایید اختلافاتی که بین آنالوگ‌های مختلف

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-09-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.10.9]

پروتئین‌های مقاومت متعلق به خانواده NBS_LRR در کولتیوارهای مختلف بادام ایران وجود دارد، نشان می‌دهد که این تغییرات در طول کاشت این کولتیوارهای در نواحی بادام کاری ایران اتفاق افتاده است که نتیجه آن تمایز در آنالوگ‌های مقاومت خانواده NBS_LRR در کولتیوارهای مختلف بادام ایران است.

منابع

Ahmadi A, Gholizadeh H, Ebadzadeh H, Hatami F, Hoseinpour R, Abdshah H, Rezaei MM, Fazli Estabragh M (2017) Agricultural estatictics of 1395. Ministry of Jahade-Agriculture publisher. Tejran, Iran (In Farsi).

Amirghsemi T (2002) Almond (culture, production). Ayandegan publisher, Tehran, Iran (In Farsi).

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

Borges A, Rosa MS, Recchia GH, Queiroz-Silva JRD, Bressan EDA, Veasey EA (2009) CTAB methods for DNA extraction of sweetpotato for microsatellite analysis. Scientia Agricola 66: 529-534.

Cao K, Wang L, Zhu G, Fang W, Chen C, Zhao P (2011) Construction of a linkage map and identification of resistance gene analog markers for root-knot nematodes in wild peach, *Prunus kansuensis*. Journal of Aerican Society of Horticultural Science 136:190-197.

Darvishian M (2010) Almond, culture and production. Iranian Scientific Publisher, Tehran, Iran (In Farsi).

Doyle JJ (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

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

Fang-quan X, Jian-fang HU, Zheng XU, Kang L, Ian-zhong L (2010) Cloning and expression analysis of fragments related to root-knot nematode resistance from wild Myrobalan plum (*Prunus sogdiana*). Journal of China Agricultural University 15:77-83

Hammond-Kosack KE, Jones JD (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. The Plant Cell 8:1773-1791.

Hulbert SH, Webb CA, Smith SM and Sun Q (2001) Resistance gene complexes: evolution and utilization. Annual Review of Phytopathology 39:285-312.

Kanazin V, Marek LF, Shoemaker RC (1996) Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. Proceedings of the National Academy of Sciences 93:11746-11750.

Khan MA (2009) Importance and use of resistance gene analogs. Open Plant Science Journal 3:54-60.

Kozjak P, Jakše J, Javornik B (2009) Isolation and sequence analysis of NBS–LRR disease resistance gene analogues from hop Humulus lupulus L. Plant Science 176:775-782.

Kump B, Javornik B (1996) Evaluation of genetic variability among common buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench.) populations by RAPD markers. Plant Science 114:149-158

Leister RT, Ausubel FM, Katagiri F (1196) Molecular recognition of pathogen attack occurs inside of plant cells in plant disease resistance specified by the *Arabidopsis* genes RPS2 and RPM1. Proceedings or the National Academy Sciences, Washington, v.93, p.15497-15502.

Lalli DA, Decroocq V, Blenda AV, Schurdi-Levraud V, Garay L, Le Gall O, Abbott A G (2005) Identification and mapping of resistance gene analogs (RGAs) in Prunus: a resistance map for Prunus. Theoretical and applied genetics 111:504-1513.

Samani MS, Fadaei AA (2015) Pathogensity study and losses of root knot nematode on combination of rootstics in almond. Plant Protection 38:26-36. (In Farsi).

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molocular and Biological Evolotion 24:1596-1599.

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

Yu YG, Buss GR, Maroof MA (1996) Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. Proceedings of the National Academy of Sciences 93:11751-11756.

Zhang Y, Lubberstedt T, Xu M (2013) The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. Journal of Genetics and Genomics 40:23-35.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-09-14]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.10.9]