

تنوع نوکلئوتیدی ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس گندم نان

رحیمه همتی گوگه^۱، سید ابوالقاسم محمدی^{۲*}، سعید اهری‌زاد^۳

^۱ فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۲ استاد، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۳ قطب علمی اصلاح مولکولی غلات، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۱۲

چکیده

زنگ قهوه‌ای (Leaf rust) یکی از بیماری‌های مهم گندم در سطح جهان است که اپیدمی آن منجر به کاهش عملکرد و کیفیت گندم نان می‌شود. در این مطالعه، تغییرات ساختاری و تنوع نوکلئوتیدی ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای *Lr1*، *Lr21*، *Lr51* و *Lr39* در هفت ژنوتیپ گندم نان با واکنش متفاوت به زنگ قهوه‌ای بررسی گردید. ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای و یا نواحی پیوسته با این ژن‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده بر اساس توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی تکثیر شدند. قطعات تکثیری در باکتری *E. coli* همسانه‌سازی و توالی‌یابی گردیدند. هم‌ردیف کردن توالی ژن‌های مورد مطالعه با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی NCBI، شباهت بالای آن‌ها را با توالی ژن‌های مقاومت از جمله ژن‌های خانواده NBS-LR و RGA نشان داد. هم‌ردیفی قطعات تکثیر شده از ژن‌های مورد مطالعه با توالی‌های موجود در NCBI نشان دهنده شباهت قطعه تکثیر شده از ژن *Lr51* با ژن *agp2* بود. توالی ژن *Lr39* با ژن *VRN1*، مسئول بهاره‌سازی در گندم زمستانه، ۸۸ شباهت درصد داشت. نتایج بدست آمده از هم‌ردیف کردن توالی‌ها و گروه‌بندی آن‌ها، حاکی از وجود تغییرات ساختاری و تنوع نوکلئوتیدی این ژن‌ها در ارقام مورد مطالعه بود. نسبت جایگزینی‌های همانم به ناهمانم (Ka/Ks) در قطعات تکثیر شده از ژن *Lr1* با استفاده از جفت آغازگرهای *Lr1-2*، *Lr1-3* و *Lr1-4* و ژن‌های *Lr21* و *Lr39* کوچکتر از یک و نشان دهنده گزینش منفی برای جایگزینی یک اسیدآمینو در این ناحیه از این ژن‌ها بود. در قطعه ژن تکثیر شده از ژن *Lr1* با استفاده از جفت آغازگر *Lr1-5* نسبت Ka/Ks بیشتر از یک و نشان دهنده گزینش مثبت یا گزینش در جهت ایجاد تنوع برای جایگزینی یک اسیدآمینو است. از نظر توالی ژن‌های *Lr1*، *Lr21*، *Lr39* و *Lr51*، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه فقط از نظر چند نوکلئوتید تفاوت داشتند که براساس این تفاوت‌های نوکلئوتیدی می‌توان آغازگرهای اختصاصی مبتنی بر SNP‌ها جهت شناسایی ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم طراحی کرد.

کلمات کلیدی: زنگ قهوه‌ای، تنوع نوکلئوتیدی، ژن‌های مقاومت به بیماری.

مقدمه

در بین گیاهان زراعی، گندم نان بزرگترین ژنوم را دارا است (Arumuganathan & Earle, 1991) که حدود ۸۰-۹۰ درصد آن دارای توالی‌های تکراری بوده و ۷۰ درصد عناصر متحرک^۱ (TEs) می‌باشد (Feuillet *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). زنگ قهوه‌ای یکی از بیماری‌های قارچی مهم گندم است که بیشترین پراکنش را در سطح جهان دارد و تولید گندم را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در نقاطی که ارقام حساس کشت شده باشند و شرایط محیطی برای ایجاد آلودگی بوسیله یوردینیا مناسب باشد، به میزان زیادی روی پهنک برگ‌ها مشاهده می‌شود. اپیدمی این بیماری خسارت شدیدی به عملکرد دانه وارد کرده و کیفیت غذایی آن را پائین می‌آورد (Ling *et al.*, 2004).

گیاهان دارای مکانیسم‌های دفاعی موثری برای شناسایی و پاسخ به آلودگی‌های ایجاد شده توسط پاتوژن‌ها می‌باشند. آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت گیاهی^۲ (RGAs) بعنوان ژن‌های کاندیدا، دارای موتیف‌ها و دومین‌های حفاظت‌شده‌ای هستند که نقش خاصی را در مقاومت به پاتوژن ایفا می‌نمایند (Sekhwal *et al.*, 2015). شناخته شده‌ترین RGAها دارای ناحیه اتصال به

نوکلئوتید، ناحیه غنی از لوسین، شبه گیرنده‌های کینازی^۳ RLK، و شبه گیرنده‌های پروتئینی^۴ RLP می‌باشند. با استفاده از ویژگی‌های فوق تاکنون پنج گروه از ژن‌های مقاومت شناسائی شده‌اند. بزرگترین گروه این ژن‌ها پروتئین‌هایی را با جایگاه^۵ NBS-LRR رمز می‌کنند (Huang *et al.*, 2003). این پروتئین‌ها یک جایگاه مرکزی با یک مکان اتصال به نوکلئوتید دارند (Hommand-Kosak & Jones, 1997). مرکز این جایگاه می‌تواند دارای یک جایگاه P-loop/Kinase1-a، جایگاه کیناز^۲، کیناز^۳ و یک جایگاه آبگریز باشد. با استفاده از آغازگرهای طراحی شده بر اساس P-loop/Kinase (GLPL) همولوگ‌های زیادی از NBS را در گونه‌های مختلف گیاهی شناسایی شده است (Mayerse *et al.*, 1999). این پروتئین‌ها دارای یک جایگاه حفاظت شده دیگر در انتهای آمینی با بنیان‌های تکراری غنی از لوسین می‌باشند. جایگاه LRR در برخی از محصولات ژن‌های R بعنوان جایگاه اتصال برای لیگاندها^۶ محسوب می‌شود، این لیگاندها در نتیجه فعالیت ژن Avr ایجاد می‌گردد (Bent, 1996).

بیش از ۵۰ ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای در ژرم پلاسماهای گندم و گونه‌های خویشاوند

^۳ Receptor Like Kinase

^۴ Receptor Like Protein

^۵ Nucleotide binding site – Leucine-rich repeats

^۶ Ligand

^۱ Transposable Elements

^۲ Resistance gene analogs

ژن *Lr51* از کروموزوم *Triticum 1S* *speltoides* از طریق جابجائی یک قطعه کروموزومی به بازوی بلند کروموزوم 1B گندم نان منتقل شده است (Helguera et al., 2005). ژن *Lr39* روی بازوی کوتاه کروموزوم 2D قرار دارد و مقاومت به زنگ قهوه‌ای را در مرحله گیاهچه و گیاه بالغ القاء می‌کند. بررسی‌ها نشان داده است که این ژن از سایر ژن‌های *Lr* متفاوت می‌باشد. از هشت نشانگر ریزماهواره برای تجزیه پیوستگی این ژن در کروموزوم 2D استفاده شده است. منشاء این ژن گونه *Ae. tauschii* بوده و از طریق تلاقی بین‌گونه‌ای به گندم نان منتقل شده است (Raupp et al., 2001).

هدف از این بررسی، جداسازی قطعاتی از ژن‌ها یا نواحی پیوسته با آن‌ها، همسانه کردن و توالی‌یابی ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای *Lr1*، *Lr21*، *Lr51* و *Lr39* در هفت ژنوتیپ گندم نان با واکنش متفاوت به زنگ قهوه‌ای جهت یافتن تنوع نوکلئوتیدی موجود در این نواحی بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی شامل هفت ژنوتیپ گندم نان با درجات متفاوت مقاومت به زنگ قهوه‌ای در مرحله گیاهچه و گیاه کامل بودند که از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کشور تهیه شدند (جدول ۱).

وحشی آن شناسایی و تعدادی از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی گندم استفاده شده است (Feuillet et al., 2003). جایگاه کروموزومی اغلب ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای تعیین و تحت نام‌های *Lr1* تا *Lr51* شماره‌گذاری شده‌اند (Kolmer, 1996). سه ژن *Lr1*، *Lr10* و *Lr21* از گندم هگزاپلوئید جداسازی و همسانه سازی شده‌اند (Cloutier et al., 2007; Feuillet et al., 2003; Huang et al., 2003). ژن *Lr1* اولین بار از رقم Malacof گزارش (Mains et al., 1923; Ausemus et al., 1946) و سپس در گندم هگزاپلوئید *Glenlea* نیز شناسایی گردید (Sambroski, 1973; Dyck et al., 1985; McVey, 1989). *Lr1* یک ژن مقاومت به بیماری با جایگاه Coiled Coil، NBS و LRR می‌باشد (Cloutier et al., 2007).

ژن *Lr21* از گونه *Aegilops tauschii* به رقم Thacher گندم نان منتقل شده است (Rowland & Kerber, 1974). این ژن اولین بار توسط Huang et al. (2003) جداسازی و همسانه شد.

ژن *Lr21* در ناحیه غنی از ژن در قسمت انتهایی بازوی کوتاه کروموزوم 1D گندم نان به طول ۴۳۵۹ جفت باز قرار دارد و ناحیه رمزکننده ژن *Lr21*، پروتئینی با یک جایگاه NBS حفاظت شده و ۱۳ تکرار غنی از لوسین ناقص متعلق به خانواده NBS-LRR را رمز می‌کند (Huang et al., 2003).

جدول ۱- واکنش ژنوتیپ‌های گندم نان مورد مطالعه به زنگ قهوه‌ای در مرحله گیاهچه و گیاه کامل.

Table 1- Response of the he studied bread wheat genotypes to leaf rust at seedling and adult plant stages.

مرحله گیاه کامل adult plant stage	مرحله گیاهچه Seedling Stage	ژنوتیپ Genotype
مقاوم - نیمه مقاوم Resistance- semi resistance	حساس - نیمه حساس Susceptible- Semi susceptible	MV-17
حساس Susceptible	حساس Susceptible	بولانی Bolani
حساس - نیمه حساس Susceptible- semi susceptible	حساس Susceptible	پیش‌تاز Pishtaz
حساس - نیمه حساس Susceptible- semi susceptible	حساس Susceptible	N-80-6 (مغان 3)
نیمه مقاوم - نیمه حساس Semi resistance- semi susceptible	مقاوم resistance	MKH3
نیمه مقاوم - نیمه حساس Semi resistance- semi susceptible	حساس Susceptible	MKH4
نیمه مقاوم - نیمه حساس Semi resistance- semi susceptible	حساس Susceptible	بولوئیکا (بهار) (M-79-7)
Semi resistance- semi susceptible	Susceptible	

تعیین شد. برای تکثیر ژن‌های مقاوم به زنگ قهوه‌ای *Lr1*، *Lr21*، *Lr51* و *Lr39* از جفت آغازگرهای طراحی شده بر اساس اطلاعات موجود در NCBI استفاده شد (جدول ۲).

استخراج DNA ژنومی با روش CTAB (Saghai-Marooft *et al.*, 1984) انجام و کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژنهای مقاومت به زنگ قهوه‌ای *Lr1* *Lr21* *Lr51* و *Lr39* و دمای اتصال آنها.

Table 2- The primer used for amplification of leaf rust resistance genes *Lr1*, *Lr21*, *Lr51*, and *Lr39* and their annealing temperatures.

آغازگر Primer	توالی آغازگرها Primer Sequences	ژن Gene	دمای اتصال Annealing temperature
Lr1-2F	5'-TCC ACG CCA CCA ACT ACG -3'	<i>Lr1</i>	52 °C
Lr1-2R	5'-GCC GAG CAA ATCAGA GAC -3'		
Lr1-3F	5'-ACA CCC TGT TTC TGT TCT TCC -3'	<i>Lr1</i>	53 °C
Lr1-3R	5'-CTG CTG CTT CCT TCT TC -3'		
Lr1-4F	5'-CTG GTT CTT GTG CCT GAG G -3'	<i>Lr1</i>	53 °C
Lr1-4R	5'- GGT TGA CTG CGA TGA GAG G -3'		
Lr1-5F	5'- AGG AGA AGG AGA ATG GAG GAG -3'	<i>Lr1</i>	52 °C
Lr1-5R	5'-GGT TGA CTG CGA TGA GAG G -3'		
D14-L, D14-F	5'- CGC TTT TAC CGA GAT TGG TC -3' 5'- CCA AG AGC ATC CAT GGT GT -3'	<i>Lr21</i>	62 °C
Gdm35-L	5'- CCT GCT CTG CCC TAG ATA CG -3'	<i>Lr39</i>	49.6 °C
Gdm35-R	5'- TGG CTG CTC AGA AAA CTG GAC C -3'		
S30-13L, AGA7-759R	5'- GCA TCA ACA AGA TAT TCG TTA TGA CC -3' 5'- TGG CTG CTC AGA AAA CTG GAC C-3'	<i>Lr51</i>	56.8 °C

گرفت و قطعات برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن^۷ کره‌جنوبی ارسال شد. توالی‌های حاصله با استفاده از برنامه Chromas Lit 2.01 تجزیه و تحلیل شد. مقایسه توالی‌ها با همولوگ-های آن با استفاده از الگوریتم هم‌ردیفی چندگانه در Clastalx ver. 1.8 و Clastalw ver 1.6 انجام و دندروگرام با استفاده از الگوریتم Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987) و ضریب فاصله P-distance در برنامه MEGA 4 ترسیم گردید (Kulmar et al., 2008). تنوع نوکلئوتیدی

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم نهایی ۱۰µl و با استفاده از پروتکل سیمیت (CIMMYT, 2005) انجام شد. قطعات تکثیری پس از جداسازی از ژل به ناقل pTZ57RT الحاق و در باکتری *E. coli* سویه DH5α همسانه شدند. تهیه سلول‌های مستعد با استفاده از روش کوهن و همکاران (Cohen et al., 1972) انجام و کلنی‌های سفید رنگ حاوی قطعات تکثیری برای استخراج پلاسمید انتخاب گردیدند. استخراج پلاسمید براساس روش پیشنهادی بیرنبوئیم و دالی (Birnboim & Doly, 1979) صورت

^۷ Macrogen

ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با RGAها از گروه LZ-NBS-LRR، پروتئین‌های دفاعی شبه HCBT⁹ و LZ-NBS-LRR از *Ae. tauschii* نمونه TA2468، شباهت ۹۰ درصدی نشان دادند. اطلاعات مربوط به ژن‌ها و درصد شباهت آن‌ها در جدول ۳ آورده شده است. هانگ و همکاران (Huang et al., 2003) نیز با استفاده از نشانگر اختصاصی STS، KSUD14-STS قطعه ۱۴۱۰ جفت‌بازی را در گندم‌های تراریزش شده بوسیله کلون کاسمید ۶۹-۷-۱ تکثیر کردند. علاوه بر این، در برخی از ارقام مقاوم به پاتوزن، یک قطعه ۱۳۶۰ جفت‌بازی از این ژن تکثیر شد. بر اساس توالی‌یابی مجدد مبتنی بر جمعیت، چهار حذف/اضافه (indel) (۲ جفت باز در ناحیه اسید آمینه‌ای، ۸۸ یا ۱۰۵ جفت باز در اولین اینترون، یک جفت باز در ناحیه NBS و یک حذف و اضافه در ناحیه LRR) و ۱۳ چندشکلی تک نوکلئوتیدی SNP در ارقام گندم معرفی شده در زمان‌های مختلفی در ژن *Lr21* شناسایی شد (Fu et al., 2010). در پژوهشی Neelam et al. (2013) نیز آغازگرهای اختصاصی آلل برای ارزیابی‌های KASPar در محدوده ناحیه اتصال حذف/اضافه در موقعیت ۱۳۴۶ جفت‌بازی طراحی کردند. با استفاده از چهار جفت آغازگر Lr1-2، Lr1-3، Lr1-4 و Lr1-5 بترتیب قطعاتی به طول ۲۴۴، ۲۲۶، ۷۸۸ و ۷۸۰ جفت باز از ژن

بین ارقام و میزان جایگزینی‌های همنام (Ks) و جایگزینی‌های غیرهمنام (Ka) در ژن‌های مورد بررسی با استفاده از برنامه DNAsp ver 4.0 برآورد شد (Rozas et al., 2010). میزان شباهت‌ها و تفاوت‌ها با توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی از جمله NCBI⁸ از طریق بلاست این توالی‌ها بدست آمد.

نتایج و بحث

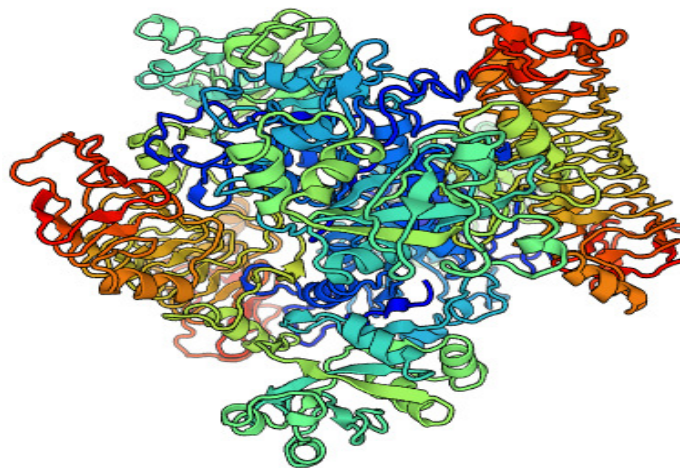
با استفاده از جفت آغازگر D14، قطعاتی به طول ۱۵۰۰ جفت باز از ژن *Lr21* تکثیر شد. شکل a1 نشانگر ناحیه تکثیر شده از این ژن با استفاده از آغازگر و شکل a2 نشان دهنده قطعات پس از همسانه‌سازی و برش آنزیمی می‌باشد. تنوع نوکلئوتیدی برابر با ۰/۴ بود. جستجو در بانک‌های اطلاعاتی NCBI و UniProt برای دومین‌های حفاظت شده نشان داد که این ژن متعلق به خانواده NB-ARC superfamily با ۱۹۲ آمینواسید است (شکل ۱). طول کامل ناحیه رمزکننده این ژن برابر با ۳۲۴۳ جفت باز با توالی موجود در NCBI با شماره دسترسی FJ876280 در گندم نان مشابهت داشت. هم‌ردیف کردن توالی این ژن در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با توالی‌های موجود در NCBI نشان دهنده شباهت ۹۹ درصدی آن‌ها با توالی‌های ژن *Lr21* در NCBI و الل نوترکیب S مربوط به ژن *Lr21* از *Ae. tauschii* بود. همچنین توالی ژن *Lr21* در

⁹ N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase HCBT-Like Putative Pathogenesis Related

⁸ National Center for Biotechnology Information

پروتئین مقاومت به بیماری RGA3 از *Ae. tauschii* subsp. *tauschii* با شماره دسترسی XP_020148468.1 نیز شباهت ۱۰۰ درصدی داشت که این پروتئین هم دارای یک NB-ARC domain می‌باشد (شکل ۳). در پژوهشی *Qiu et al.* (2007) براساس چهار RGA از ارقام مقاوم و حساس، آغازگرهای اختصاصی طراحی و قطعاتی را تکثیر، همسانه سازی و توالی‌یابی کردند. آن‌ها اختلافات موجود بین لاین‌های مادری جمعیت هدف، جهت تعیین نقشه فیزیکی، را شناسایی نموده و بر پایه تفاوت های نوکلئوتیدی موجود توانستند آغازگرهای Lr1RGA1 و Lr1RGA2 را طراحی کنند. با استفاده از نشانگر CAPS به نام Lr1RGA1 قطعاتی بطول ۷۶۰ جفت باز تکثیر شد.

Lr1 تکثیر شد (شکل ۲b). قطعات ژن *Lr1* با توالی ژن *Lr1* موجود در NCBI رقم *Glenlea* شباهت ۱۰۰ درصد و با ژن *Lr34* شباهت ۸۸ درصد نشان داد که می‌تواند نشان دهنده شباهت ساختاری این دو ژن باهم باشد. قطعه تکثیر شده با آغازگر Lr1-5 با پروتئین RLP: Receptor-like protein 12 از *T. urartu* با شماره دسترسی EMS65378.1 دارای شباهت ۷۵ درصدی بود (شکل ۴a). این پروتئین با نام LRR-RI (تکرارهای غنی از لوسین - بازدارنده ریبونوکلاز)، معمولاً در غشای پلاسمایی واقع شده و در روابط متقابل پروتئین - پروتئین دخالت دارد. همچنین قطعه تکثیر شده با آغازگر Lr1-3 نیز متعلق به *Lr1* و خانواده بزرگ دومین P-loop NTPase در گندم نان با شماره دسترسی ABS29034.1 بود (شکل ۴b). این قطعه با



شکل ۱- ساختار سه بعدی *Glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1* با ۵۱۶ اسید آمینه (UniProtKB با شماره دسترسی P55241).

Figure 1- Three dimensional structure of *Glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1* with 516 amino acid residue (UniProtKB with Accession_NO P55241).

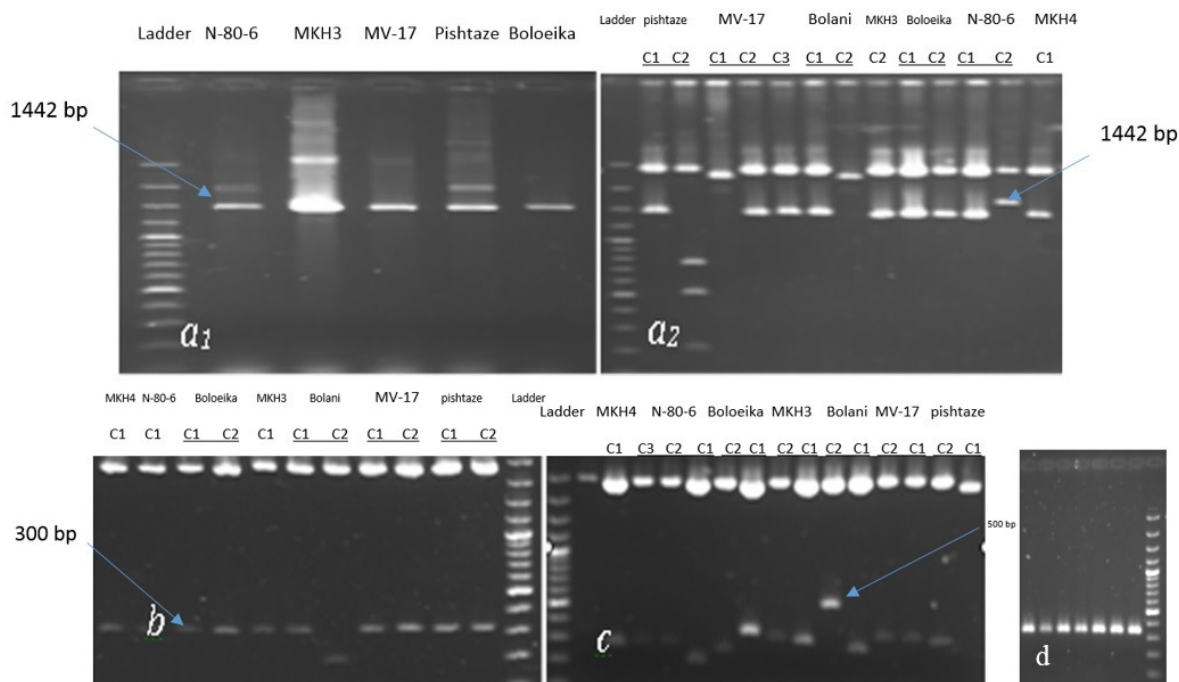
جدول ۳- شباهت قطعه توالی یابی شده از ژن *Lr21* با توالی‌های موجود در NCBI.

Table 3- Similarity of sequenced fragments from *Lr21* gene with the sequences available in NCBI.

شماره دسترسی Accession NO	مشخصات توالی Sequence features	درصد شباهت Identification percentage
GQ504849.1	<i>Triticum aestivum</i> strain CN 106423 wheat leaf rust resistance Lr21 pseudogene, partial sequence	99%
GQ504758.1	<i>Triticum aestivum</i> strain CN 11999 wheat leaf rust resistance Lr21 pseudogene, partial sequence	99%
AY139586.1	<i>Triticum aestivum</i> Lr21 gene, Lr21-S allele, partial sequence	99%
FJ876286.1	<i>Aegilops tauschii</i> clone TA2471 Lr21 pseudogene, complete sequence	
FJ876280.1	<i>Triticum aestivum</i> Lr21 gene, complete sequenc	99%
FJ876294.1	<i>Triticum aestivum</i> clone w Lr21 pseudogene, complete sequence	99%
AY139587.1	<i>Triticum aestivum</i> Lr21 gene, Lr21-R-S recombinant allele, partial sequence	99%
AY613783.1	<i>Aegilops tauschii</i> isolate TA2468 clone 1 LZ-NBS-LRR class RGA and NBS-LRR class RGA genes, complete cds	90%
AH012974.2	<i>Aegilops tauschii</i> strain TA1649 transposon putative Ty3-gypsy-type retroelement, complete sequence; Lr21 gene, complete cds; transposon putative gypsy-type retroelement, complete sequence; putative GAG-POL precursor, gene, complete cds; and unknown genes	99%
AF446141.1	<i>Aegilops tauschii</i> LZ-NBS-LRR class RGA, NBS-LRR class RGA, HCBT-like putative defense response protein, and putative alliin lyase genes, complete cds; and unknown genes	90%

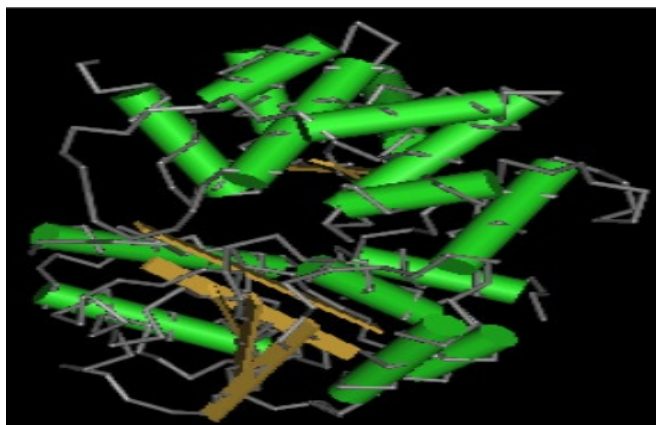
این ژن با ژن *agp2* رمز کننده زیر واحد بزرگ ADP- گلوکز پیروفسفوریلاز، شباهت ۹۸ درصدی و با پروتئین Glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1 شباهت ۹۹ درصدی دارد. این پروتئین در کلروپلاست و آمیلوپلاست واقع شده و ساختار سه بعدی آن در شکل ۵ آورده شده است.

با استفاده از جفت آغازگر S30-13L و AGA7-759R، قطعاتی از ژن *Lr51* بطول ۷۹۳ جفت باز در چهار رقم بولانی (۷۹۲ جفت باز)، N-80-6 (مغان ۳) (۶۷۲)، پیشتاز (۶۷۷) و بولونیکا (بهار) (۶۹ جفت باز) تکثیر و توالی‌یابی شد (در سه ژنوتیپ MKH3، MKH4 و MV17 قطعه‌ای تکثیر نشد). بلاست توالی‌ها نشان داد که



شکل ۲- a1) قطعه ۱۴۴۲ جفت بازی از ژن *Lr21* (a2) الگوی نواری پلاسمیدهای برش یافته با آنزیم- های *EcoRI* و *HindIII* و قطعه درجی ۱۴۴۲ جفت بازی، (b) قطعه ۳۰۰ جفت بازی از ژن *Lr1*، (c) قطعه ۵۰۰ جفت بازی از ژن *Lr39* (d و نشانگر ۱۰۰ جفت بازی).

Figure 2- a1) 1442 bp fragment from *Lr21* gene, a2) Banding pattern of plasmids digested with *EcoRI* and *HindIII* enzymes, b) inserted fragment with length of 244 bp from *Lr1*, c) 500bp fragment for *Lr39* gene and d) 100bp ladder.

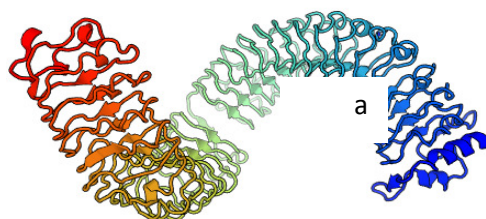
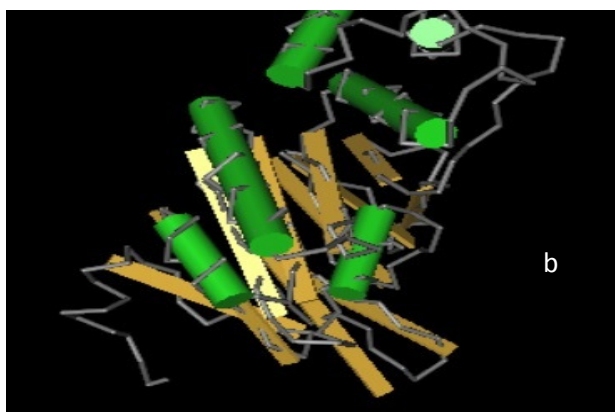


شکل ۳- ساختار سه بعدی دومین حفاظت شده NB-ARC در ژن *Lr21*.

Figure 3- Three dimensional structure of conserved NB-ARC domain in *Lr21* gene.

همکاران (Raupp *et al.*, 2001) با استفاده از آغازگرهای ریزماهواره GWM296 و GWM210 به ترتیب قطعاتی بطول ۱۴۵ و ۱۹۰ جفت باز در گندم‌های مقاوم و نمونه TA1675 *Ae. tauschii* تکثیر کردند. هم‌ردیفی توالی ژن *Lr39* با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI نشان‌دهنده شباهت ۷۷ درصدی آن با توالی ژن *Lr1* از رقم Glenlea بود. توالی ژن *Lr39* در ارقام مورد مطالعه با توالی ژن *VRN1* با شماره دسترسی AY188331.1 که مسئول بهاره‌سازی در گندم زمستانه است، نیز شباهت ۸۸ درصدی داشت.

شباهت ۹۰ درصدی این قطعه با قطعه ژن *Lr51* از رقم Neepawa با شماره دسترسی AY589011.1 و شباهت ۹۸ درصدی با توالی دیگر این ژن با شماره دسترسی AY589012.1 مشاهده شد. هلگوئرا و همکاران (Helguera *et al.*, 2005) نیز قطعات ۷۹۰ و ۸۰۰ جفت‌بازی از این ژن را تکثیر کردند. با استفاده از آغازگر Gdm35 قطعاتی با طول‌های ۲۲۷، ۲۴۷، ۱۹۲، ۲۲۴، ۲۶۹، ۱۹۷ و ۱۹۰ جفت‌بازی به ترتیب در بولانی، بولونیکا، MKH4، MKH3، پیشتاز، MV17 و N-80-6 تکثیر و توالی‌یابی شد (شکل 2c, 2d). راپ و



شکل ۴- a) ساختار سه بعدی Receptor like protein در ژن *Lr1* (b) ساختار سه بعدی پروتئین متعلق به خانواده P-loop NTPase domain superfamily.

Figure 4- a) Three dimensional structure of Receptor like protein in *Lr1* gene, b) Three dimensional structure of protein belonging to *Lr1* gene from P-loop NTPase domain superfamily.

نان از عواملی است که شناسایی و همسانه‌سازی ژن‌ها را با مشکل مواجه می‌سازد (Feuillet et al., 2003). محققان دیگر (Huang et al., 2003) نیز بعد از توالی‌یابی مشاهده کردند که بعضی از این توالی‌ها با اجزای شبه ترانسپوزونی یا با پروتئین‌هایی که عملکرد آن‌ها شناخته شده نیست، هم‌ردیف می‌شوند. پروتئین‌های گیاهی که بوسیله ژن‌های مقاومت به بیماری رمز می‌شوند، در شناسایی حمله پاتوژن‌ها و سپس در فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی دخالت دارند. نوع (CNL: Coiled coil Nucleotide binding site) (Leucine rich region) از ژن‌های مقاومت به بیماری در همه گونه‌های گیاهی وجود دارند.

مطالعه‌ای توسط Benson et al. (2014) با هدف شناسایی عناصر تنظیم کننده با فعالیت Cis (CREs) در ژن‌های مقاومت به بیماری CNL، تعیین تنوع و توزیع آن‌ها در بین ۶ گونه گیاهی *Populus*، *Glycine max*، *Oryza sativa*، *Medicago truncatula*، *trichocarpa*، *Phaseolus vulgaris* و *Arabidopsis thaliana* انجام شد. آن‌ها به روش تجزیه *in silico* نشان دادند که هشت CRE در همه ژن‌ها مشترک بود و ۳۰ مورد از CREها فراوانی بیشتر از ۱۰ در هر ژن داشتند. *O. sativa* به عنوان تنها تک‌لپه‌ای موجود در این گروه بطور قابل توجهی تعداد پائین‌تری CRE نسبت به گونه‌های دولپه‌ای داشت. این مطالعه نشان داد که هشت CRE شناسایی شده در ۲ کیلو باز ناحیه بالاتر از ژن در

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس توالی ژن‌های مورد بررسی در شکل ۵ آورده شده است. براساس توالی ژن‌های *Lr1* و *Lr21*، رقم مقاوم MV-17 و رقم حساس بولانی در گروه‌های مجزا قرار گرفتند (شکل‌های 5a و 5c) که این به دلیل تفاوت ساختاری این ژن‌ها در ارقام مقاوم و حساس است. نتایج بدست آمده از هم‌ردیف کردن توالی‌ها و گروه بندی آن‌ها، حاکی از وجود تغییرات ساختاری و تنوع نوکلئوتیدی در بین ارقام بود. در گروه بندی با *Lr1-3* و *Lr1-5* رقم MV-17 و پیش‌تاز در یک گروه، N-80-6، بولانی و بولوئیکا در نیز در یک گروه و MKH3 و MKH4 نیز در گروه جدا قرار گرفتند. می‌توان گفت براساس گروه بندی با *Lr1*، *Lr39* و *Lr21* ارقام حساس و مقاوم جدا شده‌اند. اما این گروه-بندی نتوانست ارقام نیمه حساس-حساس، نیمه مقاوم-حساس را جدا کند. برای ژن *Lr51*، قطعه‌ای از رقم مقاوم MV-17 تکثیر نشد.

هم‌ردیفی قطعات تکثیر شده از ژن *Lr39* و *Lr1-2* در شکل ۶ و هم‌ردیفی قطعات تکثیر شده از ژن *Lr21* در شکل ۷ نشان داده شده است. ژن‌های *Lr1* و *Lr21* تکثیر شده توسط سه آغازگر فقط از نظر چند نوکلئوتید در بین ارقام تفاوت نشان دادند، ولی از نظر توالی ژن-های *Lr51* و *Lr39* تفاوت بالایی مشاهده شد. این تفاوت بالا احتمالاً می‌تواند بدلیل وجود توالی-های تکراری و ترانسپوزون‌ها باشد. وجود تعداد زیاد توالی‌های تکراری و بزرگ بودن ژنوم گندم

به منظور اجتناب از واکنش‌های ایمنی در میزبان است. این نوع گزینش برای تثبیت جایگزینی‌های مطلوب استفاده می‌شود. بالاترین نسبت جایگزینی‌های همنام در قطعه ژن *Lr1* تکثیر شده با جفت آغازگر *Lr1-5* مشاهده شد که نشان دهنده گزینش مثبت در این ناحیه از ژن *Lr1* می‌باشد. در *Lr51* این نسبت محاسبه نشد، که بدلیل عدم تکثیر در برخی از ژنوتیپ‌ها بود.

در پژوهشی *Jiang et al.* (2007) با بررسی تنوع نوکلئوتیدی ناحیه *LRR* در ژن‌های مقاومت گیاهان گزارش کردند که میزان تنوع نوکلئوتیدی و نسبت جایگزینی‌های مشابه به جایگزینی‌های غیر مشابه در واحدهای *LRR* بطور معنی‌داری متفاوت است. آنها در کل ناحیه *LRR* یک نسبت معنی‌داری از $Ka > Ks$ در چهار ژن *L*، *P*، *RPP13* و *RPP8* را شناسایی کردند. این نسبت نشان می‌دهد که ناحیه *LRR* در برخی از ژن‌های مقاومت تحت فشار گزینشی در جهت ایجاد تنوع قرار گرفته است.

سپاسگزاری

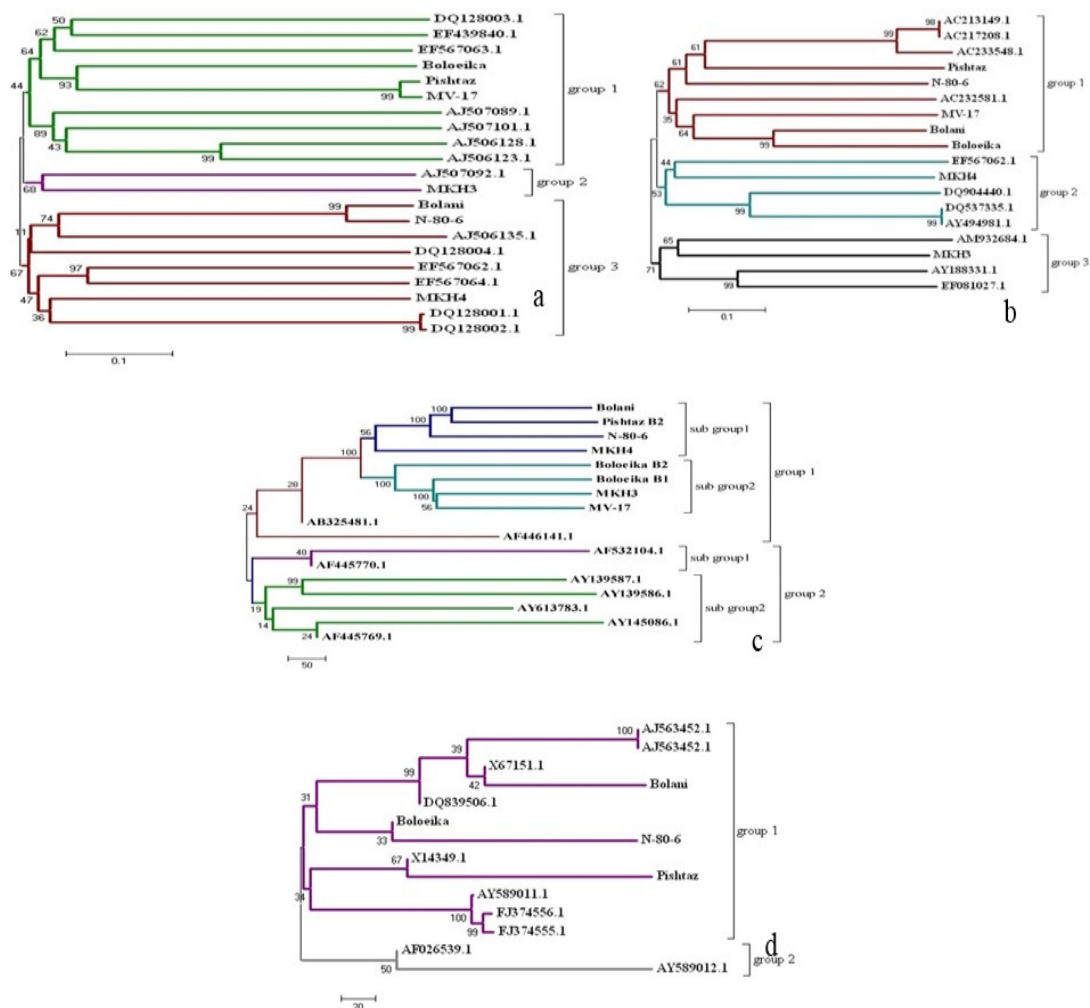
از قطب علمی اصلاح مولکولی غلات دانشگاه تبریز که هزینه این پژوهش را تامین کرده است تشکر و قدردانی می‌شود.

همه ژن‌های *CNL*‌های نمونه‌برداری شده وجود داشتند. آنها نتیجه گرفتند که این *CRE*‌ها در شروع فرایندهای رونویسی دخالت دارند. بنابراین، شناسایی و بکارگیری آنها در تعیین ژن‌های مقاومت پایدار که به روش‌های قابل پیش‌بینی رونویسی شوند و در فرایندهای انتخاب طبیعی در تولید گیاهان مقاوم اهمیت دارد و می‌تواند در اصلاح گیاهان مقاوم به بیماری مفید واقع شود بود.

در جدول ۴ میزان جایگزینی‌های همنام (Ka) و ناهمنام (Ks) در ژن‌های مورد مطالعه آورده شده است. نسبت Ka/Ks در قطعه ژن *Lr1* تکثیر شده با جفت آغازگرهای *Lr1-2*، *Lr1-3* و *Lr1-4* و در قطعات تکثیر شده از ژن‌های *Lr21* و *Lr39* کوچکتر از یک ($Ka/Ks < 1$) بود که نشان دهنده گزینش منفی^{۱۰} برای جایگزینی یک اسیدآمینو در این ناحیه از ژن *Lr1* و ژن‌های فوق می‌باشد. این حالت در جهت حذف جایگزینی‌های نامطلوب اتفاق می‌افتد. در قطعه ژن تکثیر شده از ژن *Lr1* با جفت آغازگر *Lr1-5* نسبت Ka/Ks بزرگتر از یک ($Ka/Ks > 1$) بود که نشان می‌دهد گزینش مثبت یا گزینش در جهت ایجاد تنوع^{۱۱} برای جایگزینی یک اسیدآمینو اتفاق افتاده است. این حالت گاهی اوقات در پروتئین‌های آنتی‌ژنی رمز شده بوسیله پاتوژن‌ها مشاهده می‌شود که تحت فشار گزینشی شدید در جهت ایجاد تغییر

¹⁰ Negative Selection (Purifying Selection)

¹¹ Positive (or Diversifying) Selection



شکل ۵- گروه‌بندی ارقام گندم مورد مطالعه براساس توالی ژن‌های *Lr1* (5a)، *Lr39* (5b)، *Lr21* (5c) و *Lr51* (5d).

Figure 5- Grouping of wheat genotypes based on *Lr1* (5a), *Lr39* (5b), *Lr21* (5c) and *Lr51* (5d) genes sequence.

جدول ۴- نسبت جایگزینی‌های مشابه و غیرمشابه در ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای مورد بررسی.

Table 4- Synonymous and nonsynonymous substitution rates in the studied leaf rust resistance genes.

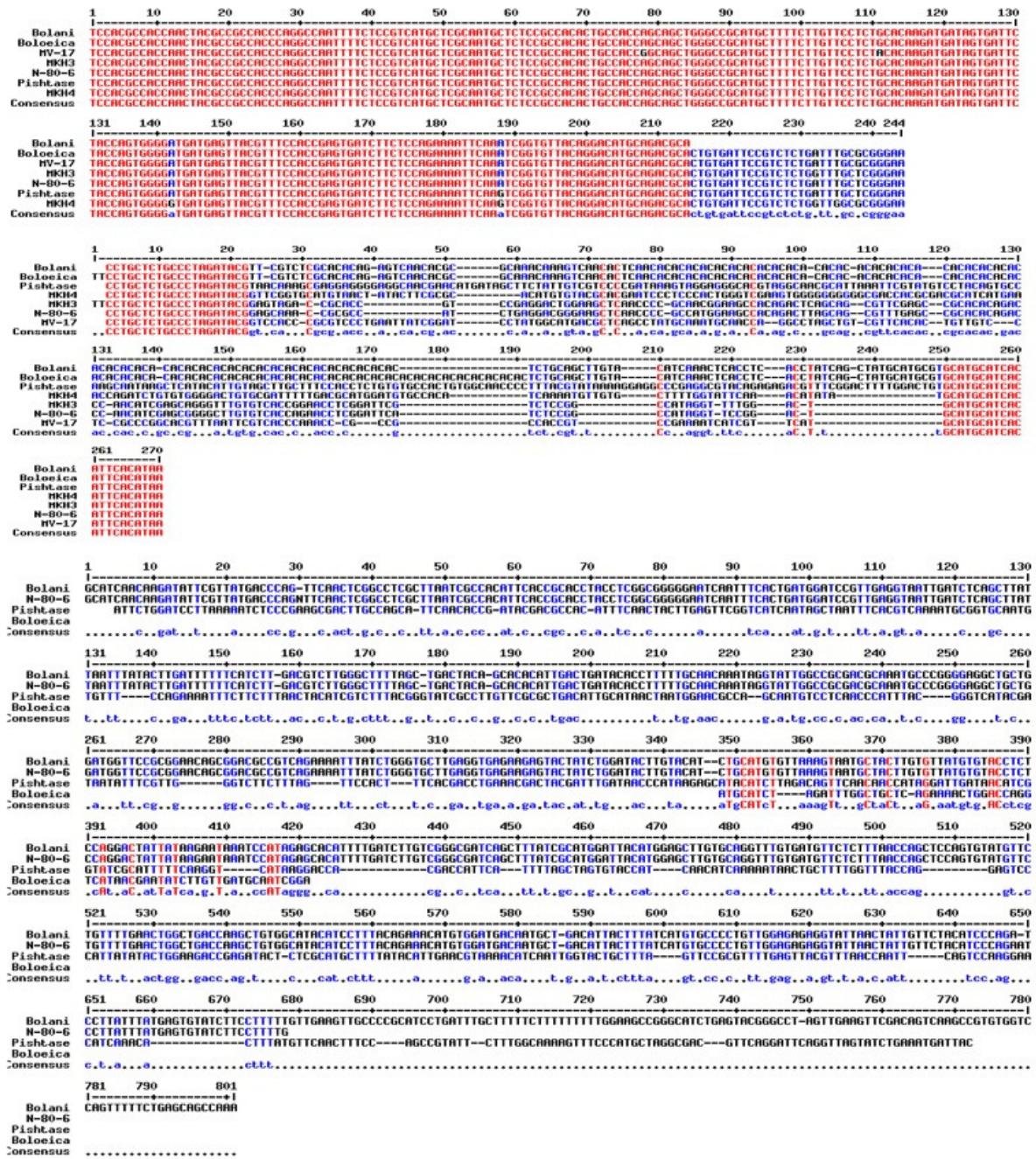
ژن Gene	جایگزینی‌های ناهمنام Ks (nonsynonymous substitution)	جایگزینی‌های همنام Ka(synonymous substitution)	انتخاب مثبت		π^a
			انتخاب منفی Purifying selection Ka/Ks ^b	انتخاب مثبت Diversifying selection Ka>Ks Ks>Ka	
<i>Lr1-2</i>	0.097	0.03585	0.2709	+ -	0.0062
<i>Lr1-3</i>	0.097	0.03585	0.2709	+ -	0.0075
<i>Lr1-4</i>	1.52349	1.99043	0.83601	+ -	0.6631
<i>Lr1-5</i>	2.4639	2.3245	1.142	- +	0.7756
<i>Lr21</i>	0.5327	0.5502	0.92706	+ -	0.3943
<i>Lr39</i>	1.5797	1.9035	0.9486	+ -	0.6847

^a میانگین تنوع نوکلئوتیدی در همه جفت مقایسات در ژن‌های مورد بررسی.

^a The mean of nucleotide diversity in all Pairs of comparisons in the studied genes.

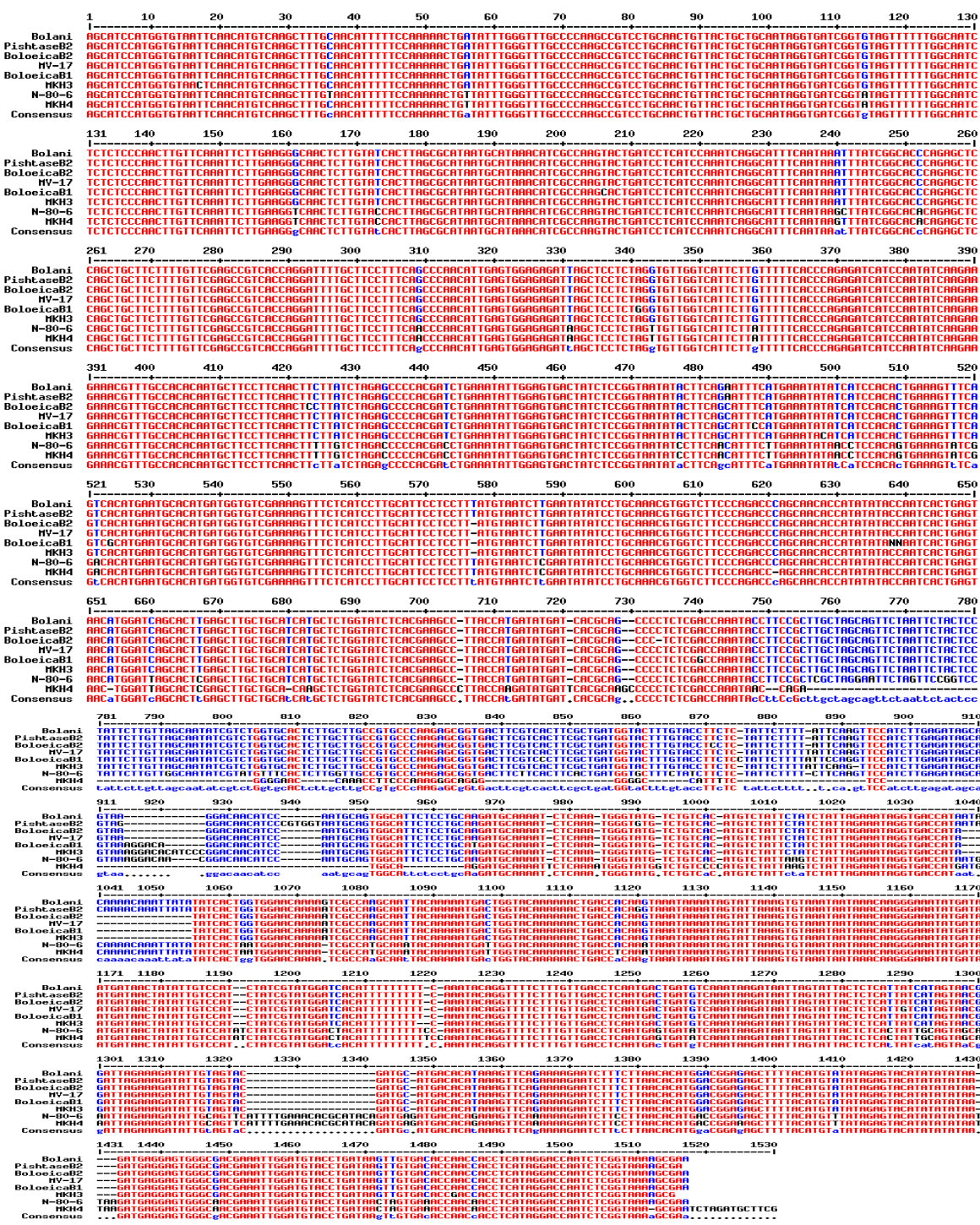
^b میانگین نسبت Ka/Ks در همه جفت مقایسات در ژن‌های مورد بررسی.

^b The mean of Ka/Ks rates in all Pairs of comparisons in the studied genes.



شکل ۶- هم ردیفی توالی ۲۴۴، ۳۹۶ و ۱۵۸ جفت بازی بترتیب از ژن های *Lr1*، *Lr39* و *Lr51*. از جفت آغازگر *Lr1-2*، *S30-13L.Gdm35* و *AGA7-759R* برای تکثیر ژن های مربوط در هفت ژنوتیپ استفاده شد. جایگاه های چندشکل با رنگ متفاوت نشان داده شده اند.

Figure 6- Sequence alignment of 244, 396, and 158 bp fragments from *Lr1*, *Lr39* and *Lr51* genes, respectively. Primer pairs *Lr1-2*, *Gdm 35*, *AGA7-759R* and *S30-13L* were used to amplify the genes in seven genotypes. Polymorphism sites are shown with different colors.



شکل ۷- توالی هم‌ردیف شده ژن *Lr21* بطول ۱۵۰۰ جفت‌باز تکثیر شده با استفاده از آغازگر D14. جایگاه‌های چندشکل به رنگ آبی و به رنگ سیاه مشاهده می‌شوند.

Figure 7- Sequence alignment for *Lr21* gene with 1500bp in length amplified with D14 primer. Polymorphism sites are shown with blue and black colors.

- Arumuganathan K, Earle D (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology* 9: 208–218.
- Ausemus ER, Harrington JB, Reitz LP, Worzella WW (1946). A summary of genetic studies in hexaploid and tetraploid wheats. *Journal Agronomy* 38: 1082–1099.
- Benson BV, Nepal MP, Davison LG, Duwadi PB, Moore BG (2014). *In silico* analysis of Cis-Regulatory elements of disease resistance genes across six plant species. *The South Dakota Academy of Science* 93: 133.
- Bent AF (1996). Plant disease resistance genes: Function meets structure. *Plant Cell* 8: 1757–1771.
- Birnboim HC, Doly J (1979). A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513–1523.
- CIMMYT 2005. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Third Edition. Mexico DF: CIMMYT.
- Cloutier S, McCallum BD, Loutre C, Banks TW, Wicker T, Feuillet C, Keller B, Jordan MC (2007). Leaf rust resistance gene *Lr1*, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large *psr567* gene family. *Plant Molecular Biology* 65: 93–106.
- Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972). Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 69: 2110–2114.
- Dyck PL, Kerber ER (1985). Resistance of the race-specific type. In: Roelfs AP, Bushnell WR (eds) *The cereal rusts Vol. II. Disease, distribution epidemiology and control*. Academic Press, Orlando pp. 456-500.
- Fu YB, Peterson GW, McCallum BD, Huang L (2010) Population based resequencing analysis of improved wheat germplasm at wheat leaf rust resistance locus *Lr21*. *Theoretical and Applied Genetics* 121: 271–281.
- Feuillet C, Travella S, Stein N, Albar L, Nublait A, Keller B (2003). Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 15253–15258.
- Helguera M, Khan JA, Dubcovsky J (1999). Development of PCR markers for the wheat leaf rust resistance gene *Lr47*. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1137–1143.
- Helguera M, Vanzetti L, Soria M, Khan IA, Kolmer J, Dubcovsky J (2005). PCR markers for *Triticum speltoides* leaf rust resistance gene *Lr51* and their use to develop isogenic hard red spring wheat. *Crop Science* 45: 728–734.
- Hommand-Kosak KE, Jones JDG (1997). Plant disease resistance genes. *Plant Molecular Biology* 48: 575–607.
- Huang L, Brooks SA, Li W, Fellers JP, Trick HN, Gill BS (2003). Map-based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploidy genome of bread wheat. *Genetics* 164: 655–664.
- Jiang H, Wang C, Ping L, Tian D, Yang S (2007). Pattern of LRR nucleotide variation in plant resistance genes. *Plant Science* 173: 253–261.
- Kolmer JA (1996). Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annual Review Phtology* 34: 435–455.
- Kulmar S, Dudley J, Nei M, Tamura K (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9: 299-306.
- Li W, Zhang P, Feliers JB, Friebe B, Gill BS (2004). Sequence composition, organization and evolution of the core triticeae. *Genome Plant Journal* 40: 500-511.

- Ling HQ, Qiu J, Singh RP, Keller B (2004). Identification and characterization of an *Aegilops tauschii* ortholog of the wheat leaf rust resistance gene. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1133–1138.
- Mains EB, Jakson MS (1923). Strains of the leaf rust of wheat in the United States. *Phytopathology* 13: 36.
- McVey DV (1989). Verification of infection–type data for identification of genes for resistance to leaf rust in some hard red spring wheats. *Crop Science* 29: 304–307.
- Mayerse BC, Dickerman AW, Michelmore RW, Sivaramakrishnan S, Sobral BW, Young NY (1999). Plant disease resistance genes encode members of a diverse protein family within the nucleotide–binding superfamily. *Plant Journal* 20: 317–332.
- Neelam K, Brown-Guedira G, Huang L (2013). Development and validation of a breeder-friendly KASPar marker for wheat leaf rust resistance locus *Lr21*. *Molecular Breeding* 31: 233–237
- Qiu J-W, Schurch AC, Yahiaoui N, Dong L-L, Fan H-J, Zhong Z-J, Keller B, Ling H-Q (2007). Physical mapping and identification of a candidate for leaf rust resistance gene *Lr1* of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 115: 159- 168.
- Rowland GC, Kerber ER (1974). Telocentric mapping in hexaploid wheat of genes for leaf rust resistance and other characters derived from *Aegilops squarrosa*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 16: 137-144.
- Raupp WJ, Singh S, Brown–Guedira GL, Gill BS (2001). Cytogenetic and molecular mapping of leaf rust resistance *Lr39* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 347–352.
- Rozas, J, Librado p, Sánchez-DelBarrio V, Messeguer X ,Rozas R (2010). Dnasp version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15: 174-175.
- Saghai-Marouf MA, Soliman K, Jorgensen RA, RW Allard (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 8014-8018.
- Sambroski DJ (1973). Leaf rust of wheat in Canada in 1972. *Canadian Plant Disease Survey* 52: 168-170.
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-25.
- Sekhwal M, Li P, Lam I, Wang X, Cloutier S, You FM (2015). Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 19248-19290.

Nucleotide diversity of leaf rust resistance genes in resistant and susceptible bread wheat genotypes

Hemati R.¹, Mohammadi S.A.^{*2,3}, Aharizadeh S.²

¹Former MSc Student in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran.

²Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran.

³Center of Excellence in Cereal Molecular Breeding, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Abstract

Leaf rust caused by *Puccinia triticina*, is one of the most important diseases of wheat worldwide. Epidemics of this disease can lead to severe loss of grain yield and nutritional quality. In this study, structural changes and nucleotide diversity in some of the leaf rust resistance genes was investigated in seven bread wheat genotypes. Leaf rust resistance genes or regions linked to the genes were amplified using gene specific primers designed based on the sequences available on GenBank. The amplified fragments were cloned in *E. coli* and sequenced. Based on the blast results, isolated gene sequences revealed high similarity with resistance gene sequences such as NBS-LRR genes and RGAs. Alignment of the resistant gene sequences with the sequences available in NCBI revealed the similarity of *Lr51* with *agp2* gene. *Lr39* showed 88% similarity with *VRN-1* gene a vernalization gene in winter wheat. The result of sequence alignment and grouping revealed structural changes and nucleotide diversity of these genes in the studied wheat genotypes. Synonymous /non synonymous substitution rate (Ka/Ks) in *Lr1* gene fragments amplified using Lr1-2, Lr1-3, Lr1-4, Lr21 primer pairs and *Lr39* gene was smaller than one indicating negative selection for substitution of amino acid residue in this area of *Lr1* and *Lr39* genes. In the amplified fragments of *Lr1* gene amplified using Lr1-5 primer pair, Ka/Ks was greater than one indicating positive selection for generating diversity in order to replacing an amino acid residue. The studied genotypes had few nucleotides differences for *L1*, *Lr21*, *Lr39* and *Lr51* genes sequences which could use for development of SNP specific primers for identification of resistant and susceptible genotypes.

Key words: Leaf rust, Disease resistance genes, Nucleotide diversity.

* Corresponding Author: Mohammadi A.

Tel: 0912065060

Email: mohammadi@tabrizu.ac.ir