

## چندشکلی و بیان دو پروتئین LysM-RLK در سیب‌زمینی قبل و بعد از بروز بیماری بلایت زودرس

فرهاد نظریان فیروزآبادی<sup>۱\*</sup> و کوشالاپا آجامادا<sup>۲</sup>

۱- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد.

۲- استاد، دانشکده علوم گیاهی، دانشگاه مک گیل، سنت آن د بلوو، کانادا.

\*مسئول مکاتبه: Nazarian.f@lu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۱۹

### چکیده

گیرنده‌های Lysin Motif Receptor-like Kinases (LysM-RLKs)، به دلیل وجود موتیف لیزین (LysM)، به کیتین آزاد شده از دیواره‌ی قارچ‌ها متصل و سبب فعال شدن آبخاری از پروتئین‌ها و در نهایت سبب افزایش مقاومت به پاتوژن‌ها می‌شوند. برای بررسی بیان LysM-RLKs احتمالی ژنوم سیب زمینی در یک رقم حساس (Russet Burbank) و یک ژنوتیپ نسبتاً مقاوم (F06037) به *Alternaria solani* میزان بیان و توالی LysM آنها به روش‌های بیوانفورماتیکی و مولکولی مطالعه شد. در مجموع ۳۵ پروتئین LysM-RLKs در ژنوم سیب زمینی شناسایی شد که از این تعداد، ۲۶ پروتئین بدون LysM و تعداد پنج و چهار پروتئین به ترتیب دارای یک یا دو LysM بودند. از نه گیرنده LysM-RLKs، تعداد دو گیرنده LysM-RLKs در اثر آلودگی به *A. solani* افزایش بیان نشان دادند. پروتئین PGSC0003DMP400061331 با دو LysM بیان بیشتری در مقایسه با پروتئین PGSC0003DMP400060418 با یک LysM داشت. این پروتئین‌ها به ترتیب با پروتئین CERK1 آرابیدوپسیس (AB367524) و ۹۸ و ۸۱ درصد شباهت داشتند. هم‌ردیفی ناحیه‌ی LysM این دو پروتئین با یکدیگر و با ناحیه‌ی همولوگ در پروتئین CERK1 آرابیدوپسیس نشان داد که دو LysM پروتئین PGSC0003DMP400061331 در دو رقم تفاوتی نداشتند، اما در LysM اول پروتئین PGSC0003DMP400061331 یک ناحیه به توالی "NRD" وجود دارد که در LysM دوم همین پروتئین و پروتئین CERK1 آرابیدوپسیس دیده نمی‌شود و به نظر می‌رسد که حاصل حذف یا اضافه شدگی باشد. با انجام روش‌های ویرایش ژنوم می‌توان نقش این ژن‌ها را در موضوع مقاومت یا حساسیت به قارچ *A. solani* مشخص نمود و از نتایج حاصل برای تولید گیاهان تراریخت مقاوم استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آلترناریا، کیتین، گیرنده‌های کاینازی، مقاومت ذاتی، ویرایش ژنوم.

### مقدمه

در گیاهان توسط گیرنده‌های خاص این مولکول‌ها یعنی؛ گیرنده‌های کاینازی یا شبه کاینازی<sup>۲</sup> (RKs/RLKs) صورت می‌گیرد (Shimizu et al., 2010; Zipfel, 2008). به محض اتصال برخی از این مولکول‌های خاص به RKs/RLKs عکس‌العمل‌های سریعی مانند تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) و به دنبال آن فعال‌سازی کاینازهای فعال شونده به واسطه‌ی میتوژن<sup>۳</sup> (MAPK) برای مقابله با

گیاهان برای مقابله با بسیاری از محرک‌های بیرونی از جمله، حمله‌ی پاتوژن‌های بیماری‌زا، واجد سیستم‌های دفاعی ذاتی بوده و قادرند تا بسیاری از تغییرات محیطی اطراف خود را تشخیص دهند و متناسب با نوع تنش، راهکاری برای مقابله با تهدیدهای ناشی از آنها اتخاذ نمایند (Macho and Zipfel, 2014). درک بسیاری از مولکول‌های محرک مرتبط با پاتوژن<sup>۱</sup> (PAMPs/MAMPs)

<sup>2</sup> Receptor Kinases/Receptor Like Kinases

<sup>3</sup> Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

<sup>1</sup>Pathogen/microbe-associated molecular patterns

<sup>۱</sup>(CERK1) از جمله مهمترین LysM-RLKs هستند که مطالعات زیادی روی آنها صورت گرفته است. این نوع از گیرنده‌ها دارای یک دمین خارج سلولی هستند که در آن حداقل یک موتیف لیزین (LysM) قرار دارد که مسئول اتصال به مولکول کیتین و یا اجزای تشکیل دهنده آن است. به محض اتصال به کیتین، CERK1 مبادرت به فعالیت کاینازی از طریق دمین کاتالیتیکی درون سلولی خود کرده و از این طریق با فعال نمودن سایر پروتئین‌ها، سیستم ایمنی گیاه را فعال می‌کند (Miya et al., 2007; Shimizu et al. 2010; Narusaka et al., 2013; Tanaka et al., 2013; Carotenuto et al., 2017; Erwig et al. 2017; Wang et al. 2017).

کیتین یکی از اجزا اصلی ساختمان دیواره‌ی سلولی بسیاری از قارچ‌ها است (Miya et al. 2007). چه کیتین چه اجزا دیگر سازنده‌ی آن یعنی؛ الیگوساکاریدهای کیتینی و N-کیتینو الیگوساکاریدها، از جمله مولکول‌های PAMP هستند که نقش بسزایی در تحریک و راه اندازی سیستم ایمنی گیاه بازی می‌کنند. کیتین و اجزا کوچکتر آن پس از آزاد شدن از دیواره‌ی سلولی قارچ‌ها، توسط موتیف LysM موجود در دمین خارج سلولی LysM-RLKs شناسایی می‌شود. اخیراً مشخص شده است که بسیاری از قارچ‌ها نیز دارای پروتئین‌هایی هستند که به بیرون از قارچ ترشح شده و دارای چندین موتیف LysM هستند (Bolton et al., 2008). با این حال، بیشتر پروتئین‌هایی که در شناسایی و اتصال به کیتین و به دنبال آن تحریک سیستم ایمنی گیاهان نقش دارند، حداقل دارای یک موتیف LysM در دمین خارج سلولی خود هستند (Miya et al., 2007).

شواهد نشان می‌دهند که این پروتئین‌های قارچی با اتصال و مخفی نگه داشتن مولکول‌های کیتین و الیگوکیتین‌های آزاد شده از دیواره‌ی قارچ، مانع اتصال آنها به LysM-RLKs گیاه میزبان شده و از این طریق مانع تحریک سیستم ایمنی گیاه می‌شوند (De Jonge and Thomma 2009). پروتئین CERK1، یک پروتئین غشایی

حمله و گسترش پاتوژن صورت می‌گیرد (Ray et al., 2012).

گروه متنوع و بزرگی از یک خانواده‌ی ژنی از RKs/RLKs موسوم به گیرنده‌های شبه کاینازی دارای موتیف لیزین (LysM-RLKs) به عنوان دریافت کننده‌ی پیام‌های ارسالی از شرایط محیطی عمل می‌کنند. برای مثال، خانواده RKs/RLKs در *Arabidopsis thaliana* دارای بیش از ۶۰۰ عضو است که در حدود ۲/۵٪ از کل پروتئین‌های مستندسازی شده‌ی این گیاه را تشکیل می‌دهند (Shiu and Bleecker 2001a). علاوه بر نقش دریافت پیام‌های محیطی، اعضای این خانواده وظایف مهم زیستی دیگری همانند تنظیم مراحل نمو، پاسخ دفاعی شایسته به تنش‌های زیستی و غیر زیستی محیطی را بر عهده دارند (Aalen 2017).

به طور کلی، یک گیرنده‌ی کاینازی در گیاهان از تعدادی دمین با وظایف مشخص تشکیل شده است (Aalen 2017). بسته به نوع RKs/RLKs، تعداد دمین موجود، توالی دمین‌ها، طول و گاهی محل قرارگیری آنها نسبت به یکدیگر متفاوت است. با این حال، برخی از این RLKs به نام LysM-RLKs از یک دمین خارج سلولی مسئول اتصال به لیگاند در سر N، یک دمین گذرنده از غشا، و یک دمین کاتالیتیکی (کاینازی) در سر C در درون سلول تشکیل شده‌اند که این دمین با فسفوریلاسیون خود یا پروتئین‌های دیگر، مسوول راه‌اندازی آبخار تحریک مقاومت در سلول است (Petutschnig et al., 2010; Macho and Zipfel 2014; Petutschnig et al., 2014). با توجه به تنوع فوق العاده زیاد RKs/RLKs از نظر طول، توالی، تعداد دمین و نحوه‌ی فعالیت دمین کاتالیتیکی، این پروتئین‌ها به ۴۵ زیر خانواده تقسیم بندی شده‌اند (Shiu and Bleecker 2001a; Shiu and Bleecker 2003). با این حال، تنها نقش زیستی تعدادی از این گیرنده‌های کاینازی مشخص شده است و از همه مهمتر تنها برای تعداد انگشت شماری از آنها مولکول یا مولکول‌های لیگاند ویژه شناسایی شده است (Torii 2009). گیرنده‌های کیتین الیسیاتور کایناز

<sup>1</sup> Chitin-Elicitor Receptor Kinase

*Alternaria*، تاکنون سیستم تولید مثل جنسی در این گونه گزارش نشده است (Van der Waals., 2004). میزان خسارت این قارچ به سیب زمینی در حدود ۷۸-۵ درصد برآورد می‌شود (Pasche et al., 2005). میزان خسارت به حدی است که گاهی اوقات سبب از بین رفتن کامل محصول یا بازارپسندی غده‌های سیب زمینی می‌شود. در حال حاضر، ارقام تجاری سیب زمینی به این بیماری یا مقاومت ندارند یا مقاومت در حد قابل توجهی نیست و از این رو به‌نژادگران درصد یافتن ژن‌هایی برای مقاومت به این بیماری هستند.

در جریان حمله قارچ به گیاه، آبخاری از ژن‌ها در میزبان فعال می‌شوند (Couto and Zipfel 2016). از آنجایی که گیرنده‌های کاینازی جزو ژن‌های درگیر در پاسخ ایمنی گیاهان به تنش‌ها هستند و یک گروه از این گیرنده‌ها به نام LysM-RLKs در شروع استقرار بیمارگر در گیاه فعال می‌شوند، لذا بررسی تغییرات بیان این گیرنده‌های کاینازی می‌تواند در خصوص نقش آنها اطلاعات مفیدی در اختیار ما قرار دهد. همچنین با توجه به نقش شناخته شده CERK1 در شناسایی و اتصال به کیتین (Petutschnig et al., 2010; Petutschnig et al., 2014; ) (Erwig et al., 2017) و اهمیت آن در تحریک و راه اندازی سیستم ایمنی گیاهان از یک طرف و انتشار و در دسترس بودن توالی کامل ژنوم سیب زمینی، این تحقیق به منظور بررسی بیان و شناسایی پروتئین‌های همولوگ احتمالی CERK1 آرابیدوپسیس در یک رقم تجاری و یک ژنوتیپ سیب زمینی صورت گرفت. برای این کار علاوه بر روش‌های بیوانفورماتیکی، از روش‌های مولکولی برای جستجوی اعضای خانواده گیرنده‌های کاینازی و بررسی میزان بیان آنها در پاسخ به آلودگی قارچی استفاده شد.

متعلق به خانواده‌ی گیرنده‌های کاینازی است که در دمین خارج سلولی خود دارای موتیف‌های LysM، یک دمین گذرنده از غشا و یک دمین Ser/Thr کاینازی درون سیتوپلاسمی است که توانایی خود فسفوریلاسیون دارد (Miya et al. 2007). علاوه بر کیتین و اجزا کوچکتر آن، به نظر می‌رسد که ۱-۳-β-Glc-D-هگزاساکارید نیز با همان تمایل به موتیف LysM پروتئین CERK1 متصل می‌شود و سبب انگیزش سیستم ایمنی گیاه پس از حمله پاتوژن‌ها می‌شود (Mélida et al., 2018). توالی موتیف لیزین اولین بار در لیزوزیم فاژ ۲۹φ باکتری باسیلوس پپتیدوگلیکان هیدرولاز باکتری *Enterococcus faecalis* گزارش گردید (Beliveau et al., 1991). چنین موتیفی در طیف وسیعی از پروتئین‌های مختلف و در دامنه‌ی وسیعی از موجودات زنده دیده می‌شود (Buist et al., 2008). در صورت وجود موتیف لیزین، بیشتر پروتئین‌ها دارای بیش از یک موتیف لیزین هستند که در همه‌ی موارد این موتیف‌ها با لینکرهای حاوی اسید آمینه‌های سرین، ترئونین، پرولین و اسید اسپارتیک به هم متصل شده‌اند. با این حال، در پروتئین‌های گیاهی دارای بیش از یک موتیف لیزین، در ناحیه‌ی لینکر توالی حفظ شده‌ی CXC دیده می‌شود (Madsen et al., 2003; Arrighi et al., 2006) که احتمالاً با تشکیل پل دی سولفیدی به انعطاف‌پذیری موتیف‌ها برای اتصال به لیگاند‌های مربوطه کمک می‌کند (Petutschnig et al., 2010).

بیماری بلایت زودرس یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های سیب زمینی است که توسط قارچ *A. solani* ایجاد می‌شود (Tsedaley 2014). از ویژگی‌های برجسته این قارچ می‌توان به تشکیل کنیدی‌های منفرد با نوک نخی شکل دراز اشاره کرد که در پاره‌ای از مواقع این کنیدیها در نزدیکی بدنه منشعب شده‌اند (Bagherabadi et al., 2015). همچنین دارای یک سیستم تولید مثل غیرجنسی کارآمد است و بر خلاف برخی دیگر از گونه‌های جنس

## مواد و روش‌ها

شاهد تلقیح شدند. برای این کار از روش Conrath et al. (2003) استفاده شد. به طور خلاصه، کشت *A. solani* از یک مرکز تحقیقاتی کانادا<sup>۳</sup> روی محیط PDA دریافت شد. اسپوره‌های تازه با تلقیح یک لایه نازک از غده سیب زمینی در پتری دیش و در حضور رطوبت کافی و دمای ۱۶ درجه‌ی سانتی‌گراد تهیه شدند. برای تهیه‌ی اسپور، مسیلیوم‌های قارچ با آب استریل یونیزه شده پوشش داده شدند و به مدت ۳۰ دقیقه روی یک شیکر با ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. غلظت اسپورها برای تلقیح در  $1 \times 10^5$  اسپور تثبیت شد. هر دو سوی برگ‌های کاملاً نمو یافته‌ی گیاهچه‌های سیب زمینی در دو نقطه، با مقدار ۲۰ میکرولیتر از اسپوره‌های تازه با غلظت یاد شده به کمک یک سرنگ هامیلتون (Gastight 1750DADW/S, Hamilton, Reno, NV, USA) تلقیح شدند. سپس گیاهچه‌ها برای حفظ رطوبت و کمک به آلودگی توسط قارچ با کیسه‌های پلاستیکی پوشانده شدند. یک هفته پس از تلقیح، کیسه‌های پلاستیکی از روی گیاهچه‌ها برداشته شد و نمونه‌گیری از محل آلودگی صورت گرفت.

## جداسازی RNA و تهیه cDNA

دو روز پس از تلقیح، برگ‌های تلقیح شده از گیاهچه‌ها جدا و بلافاصله در ازت مایع منجمد شدند. از کیت RNeasy Plant mini, Qiagen برای جداسازی RNA استفاده شد. غلظت RNA با دستگاه نانودراپ ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, De, USA) اندازه‌گیری شد. از کیت (Affinity Script qPCR cDNA) (Synthesis, Aligent Technologies, Canada) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده برای سنتز cDNA استفاده گردید. غلظت cDNA برای انجام آزمایش PCR با نانودراپ اندازه‌گیری و روی  $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$  تنظیم گردید.

## تکثیر شبه گیرنده‌های کاینازی

از بین گیرنده‌های LysM-RLKs که تفاوت بیان نشان دادند، دو پروتئین PGSC0003DMP400061331 و

از رقم سیب زمینی روزت بوربنک<sup>۱</sup> و ژنوتیپ F06037 به عنوان مواد گیاهی استفاده شد. رقم رزت بوربنک یک رقم تجاری مهم در امریکا و کانادا است. این رقم نسبت به بیماری اسکب نسبتاً مقاوم است اما نسبت به بیماری‌های بلایت برگ و غده حساس است. همچنین ژنوتیپ F06037 از تلاقی Frontier russet N1503-19 تولید شده است که رقم فورنتیر روزت نیز همانند روزت بوربنک رقمی تجاری است و به بیماری‌های بلایت برگ و غده حساس است، اما ژنوتیپ F06037 نسبت به بیماری‌های بلایت برگ و غده تا حدودی مقاوم است. هر دو ژنوتیپ از موسسه تحقیقات سیب زمینی، اگری-فود تهیه شدند.

## جستجوی گیرنده‌های کاینازی و شبه کاینازی در ژنوم سیب زمینی

از توالی ژن CERK1 گیاه آراییدوپسیس به شماره دسترسی AB367524 برای جستجوی ژن‌های همولوگ موجود در ژنوم سیب زمینی با استفاده از پایگاه اختصاصی Spud DB استفاده شد. از الگوریتم‌های BLASTP و BLASTN، TBASTX برای جستجوی تمام ژن‌ها و پروتئین‌های احتمالی استفاده شد. ساختار و سازماندهی دمین‌های تشکیل دهنده‌ی پروتئین‌های احتمالی با نرم افزارهای SMART، CDD، و Prosite مورد بررسی قرار گرفتند (Schultz et al., 2000; Sigrist et al., 2012; Marchler-Bauer et al., 2016) وجود توالی پپتید نشانه در پروتئین‌های شناسایی شده توسط سرور SignalP مورد بررسی قرار گرفت.

## تهیه‌ی اسپور و تلقیح گیاهچه‌های سیب زمینی

گیاهچه‌های یک ماهه هر دو ژنوتیپ توسط اسپوره‌های قارچ *Alternaria solani* یا آب استریل مقطر به عنوان

<sup>1</sup> Russet Burbank

<sup>2</sup> Potato Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC)

<sup>3</sup> AAFC, Charlottetown, PEI, Canada

پروتئین CERK1 آرابیدوپسیس به کمک الگوریتم CLUSTALW صورت گرفت (Chenna et al., 2003). هم-ردیف‌های چندگانه به کمک نرم افزار BioEdit به صورت دستی ویرایش شدند (Hall 1999) و مناطقی با افزایش (Insertion) یا کاهش (Deletion) یعنی InDel و همچنین جابجایی مشخص گردیدند.

#### بررسی سطح بیان ژنها

میزان بیان دو پروتئین PGSC0003DMP400061331 و PGSC0003DMP400060418 همولوگ پروتئین CERK1 آرابیدوپسیس در سیب زمینی با استفاده از روش RT-PCR در زمان واقعی مورد ارزیابی گرفت. برای این کار از آغازگرهای اختصاصی ناحیه LysM استفاده شد (جدول ۲). برای نرمال کردن داده‌ها از تکثیر ژن *elf-1a* به عنوان ژن رفرنس استفاده شد (Nicot et al., 2005). از روش  $\Delta\Delta Ct$  موسوم به روش لیواک با استفاده از فرمول  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  استفاده شد (Livak and Schmittgen 2001). برای هر یک از ژن‌ها و هر یک از ارقام از سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی استفاده گردید. همچنین میانگین داده‌های نهایی به کمک آزمون *t* در سطح احتمال یک درصد با هم مقایسه شدند.

PGSC0003DMP400060418 انتخاب و توالی ناحیه‌ی LysM آنها تکثیر شد. به منظور تکثیر موتیف LysM، آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالی احتمالی ژن‌های این گروه از پروتئین‌ها طراحی گردید (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) برای تکثیر نواحی حاوی LysM روی cDNA به عنوان الگو صورت گرفت. با توجه به طول محصول PCR، تکثیر در  $72^{\circ}\text{C}$  با آنزیم *Pfu* Phusion (Invitrogen, Canada) در مدت ۹۰-۴۵" صورت گرفت. همچنین دمای آنیلینگ بسته به نوع آغازگر از  $60^{\circ}\text{C}$ - $45^{\circ}\text{C}$  متغیر بود. همه واکنش‌ها در ۲۵ چرخه، پیش و اسرشت سازی در  $95^{\circ}\text{C}$  (یک مرتبه) و اسرشت سازی به مدت ۴۵" در دمای  $95^{\circ}\text{C}$  (۳۵ چرخه) صورت گرفت. محصول PCR پس از خالص سازی با کیت کپاژن (Purification kit, Qiagen PCR) به روش سانگر توالی‌یابی گردید.

#### هم‌ردیفی و جستجوی چندشکلی

توالی گیرنده‌های LysM-RLKs تکثیر شده با توالی گیرنده‌های کاینازی موجود در پایگاه داده Spud DB سیب زمینی به کمک نرم افزار مالتی الاین هم‌ردیف شدند (Corpet 1988). همچنین هم‌ردیفی بین موتیف‌های لیزین پروتئین‌های مورد مطالعه با هم و با موتیف همولوگ

جدول ۱- آغازگرها برای تکثیر موتیف LysM پروتئین‌های LysM-RLK ژنوم سیب زمینی و بررسی سطح نسخه‌برداری آنها.

Table 1. Primers used for amplification of LysM motif and transcription analysis of LysM-RLKs from potato genome.

Row (ردیف)	Primer Name (نام آغازگر)	Sequence (5'→3') (توالی آغازگر 5' به 3')
1	Fn_1331_LysM_F	CAATGTAATAGAGGCTGCGATTT
2	Fn_1331_LysM_R	GGAAAGTCCCATTTCTATCTCTTC
5	Fn_0418_LysM_F	CCTACGCAAAACCAAATAATAATG
6	Fn_0418_LysM_R	GGTGGAGATGGTCCAGCA
7	Fn-elf_F	ATTGGAACCGGATATGCTCCA
8	Fn-elf_R	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA
9	Fn-1331-RTF	TCGCCGGGACAAGGATTAAC
10	Fn-1331-RTR	TCCACTGTGCAGTCGTCAA
11	Fn-0418-RTF	TCCAGTGGACTGCTCTTGTT
12	Fn-0418-RTR	GATGTTCATCGCCAACGTCAA

## نتایج و بحث

## گیرنده‌های کاینازی ژنوم سیب‌زمینی

از آنجایی که پروتئین CERK1 نقش مهمی در فعال-سازی سیستم ایمنی گیاهان باز می‌کند (Petutschnig et al., 2014; Erwig et al., 2017; Espinoza et al., 2017; Wang et al., 2017)، با استفاده از توالی همولوگ این ژن در آراییدوپسیس، مبادرت به شناسایی ژن‌های همولوگ هم‌خانواده در کل ژنوم گیاه سیب زمینی گردید. در مجموع تعداد ۳۵ ژن احتمالی (Putative) در ژنوم سیب زمینی شناسایی گردید (جدول ۱). اگرچه به نظر می‌رسد که این ژن‌ها بتوانند تحت شرایطی فعال شوند، اما ممکن است تنها

تعدادی از آنها ژن واقعی باشند و تعدادی از آنها نیز به دلایلی ژن‌های کاذب بوده و به هر دلیلی بیان نشوند.

## ساختار گیرنده‌های کاینازی در ژنوم سیب زمینی

به طور کلی، یک گیرنده‌ی LysM-RLKs در گیاهان از تعدادی دمین با وظایف مشخص تشکیل شده است (Aalen et al., 2017). بسته به نوع LysM-RLKs، تعداد و نوع این دمین-ها، توالی آنها و گاهی محل قرارگیری آنها نسبت به یکدیگر متفاوت است. با این حال، در گیاه سیب زمینی هر LysM-RLKs از یک دمین خارج سلولی مسئول اتصال به لیگاند در سر N، یک دمین گذرنده از غشا و یک دمین کاتالیتیکی (کاینازی) در انتهای C در درون سلول تشکیل شده است (شکل ۱).



شکل ۱- شماتیک ساختار یک LysM-RLK. هر پروتئین در این گروه دارای تعدادی دمین است. SP: پپتید نشانه؛ LysM: موتیف لیزین؛ TM Domain: دمین گذرنده از غشا؛ Ser/Thr Kinase: دمین کاتالیتیکی. برخی از پروتئین‌های LysM-RLK ژنوم سیب زمینی ممکن است بیش از یک موتیف LysM داشته باشند.

**Figure 1. Schematic representation of a LysM-RLK. Structurally, each protein possesses a number of domains. SP: Signal Peptide; LysM: Lysin Motif; TM domain: Transmembrane Domain; Ser/Thr Kinase: Catalytic domain. Some LysM-RLKs of potato genome contain more than one LysM.**

گیرنده‌ی سیتوپلاسمی کاینازی<sup>۱</sup> (RLCK) یاد می‌شود (Shiu and Bleecker 2001b). با وجود فقدان چنین دمینی این گیرنده‌ها در فرآیندهای مانند نمو و پاسخ‌های دفاعی در گیاهان دخالت دارند (Lin et al., 2013; Liu et al., 2013; Shinya et al., 2014; Zhou et al., 2016). به نظر می‌رسد که هیچ رابطه‌ای بین طول پروتئین گیرنده‌های کاینازی و تعداد دمین‌های تشکیل دهنده‌ی آنها وجود نداشته باشد. برای مثال، پروتئین PGSC0003DMP400003110 به طول ۹۲۸ اسید آمینه

گیرنده‌های کاینازی ژنوم سیب زمینی حداقل از ۳۲۹ تا حداکثر ۹۶۴ اسید آمینه تشکیل شده‌اند (جدول ۲). از ۳۵ گیرنده‌ی کاینازی یا شبه کاینازی در ژنوم سیب زمینی ۷۴/۳ درصد فاقد دمین خارج سلولی بودند (جدول ۲). در بین گیرنده‌های کاینازی، ۲۵/۷ درصد فاقد دمین‌های گذرنده از غشا بودند. با وجود آنکه بسیاری از شبه گیرنده‌های کاینازی در ژنوم سیب زمینی فاقد دمین گذرنده از غشا هستند، ولی به دلیل مشابهت در دمین کاتالیتیکی آنها (Kinase domain) در گروه گیرنده‌های کاینازی قرار می‌گیرند و گاهی از آنها به عنوان شبه

<sup>1</sup> Receptor-like cytoplasmic Kinases (RLCK)

جدول ۲- فهرست تعداد ۳۵ گیرنده‌ی کاینازی یا شبه کاینازی در ژنوم سیب زمینی. از توالی ژن **CERK1** آرآیدوپسیس برای جستجوی این پروتئین‌ها در پایگاه داده‌ی سیب زمینی استفاده شده است.

**Table 2. List of 35 receptor/receptor like kinases in potato genome. AtCERK1 sequence was used to search for receptor kinase from potato genome database.**

Accession (شماره دسترسی)	#LysM	#AA	#AS	LMP	PKP	NP_ATP	ATPB	#Chro	SP	TM
<a href="#">PGSC0003DMP400069450</a>	1	641	434(D)	187-232	284-634	290-298	345	2	Y (19▼20)	Y(2)
<a href="#">PGSC0003DMP400061022</a>	1	586	423(N)	157-201	283-580	289-297	308	2	N	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400060418</a>	1	573	411(N)	144-189	225-568	231-239	289	12	Y(20▼21)	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400010799</a>	2	626	458(D)	118-229	280-610	286-294	312	9	Y (27▼28))	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400035096</a>	2	669	492(N)	115-230	301-642	307-315	356	2	Y(23▼24)	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400014242</a>	1	551	401(N)	103-147	264-550	270-278	304	2	N	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400010800</a>	2	628	460(D)	44-155	300-613	306-314	396	9	N	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400002170</a>	0	617	458(D)	-	290-587	296-304	328	2	Y (25▼26)	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400001331</a>	2	626	477(D)	41-212	328-601	334-342	355	7	Y(30▼31)	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400028741</a>	0	622	443(D)	-	322-597	328-336	349	2	Y(27▼28)	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400004478</a>	1	663	476(D)	153-197	353-640	359-367	380	3	Y(26▼27)	Y(2)
<a href="#">PGSC0003DMP400049736</a>	0	449	295(D)	-	178-448	184-192	205	1	N	N
<a href="#">PGSC0003DMP400044667</a>	0	636	416(D)	-	292-571	297-306	320	1	N	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400035500</a>	0	402	220(D)	-	91-371	97-105	119	7	N	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400067585</a>	0	329	158(D)	-	25-309	31-39	63	1	N	N
<a href="#">PGSC0003DMP400017893</a>	0	682	475(D)	-	351-631	357-365	379	2	N	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400055530</a>	0	396	210(D)	-	77-361	83-91	115	11	N	N
<a href="#">PGSC0003DMP400024973</a>	0	446	278(D)	-	153-424	159-167	189	3	Y(19▼20)	Y(2)
<a href="#">PGSC0003DMP400014236</a>	0	620	352(D)	-	223-506	229-236	251	11	Y(23▼24)	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400041017</a>	0	366	205(D)	-	73-355	79-87	101	10	N	N
<a href="#">PGSC0003DMP400049835</a>	0	433	259(D)	-	132-410	138-146	160	1	N	Y(1)

جدول ۲- ادامه

Accession (شماره دسترسی)	#LysM	#AA	#AS	LMP	PKP	NP_ATP	ATPB	#Chro	SP	TM
<a href="#">PGSC0003DMP400003110</a>	0	928	726(D)	-	600-876	606-614	628	9	Y(23▼24)	N
<a href="#">PGSC0003DMP400008268</a>	0	921	703(D)	-	574-854	580-588	602	12	Y(22▼23)	Y(3)
<a href="#">PGSC0003DMP400007826</a>	0	401	203(D)	-	68-354	78-82	106	6	N	N
<a href="#">PGSC0003DMP400002669</a>	0	422	239(D)	-	116-376	122-130	144	2	N	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400014755</a>	0	964	753(D)	-	629-903	635-643	657	10	Y(22▼23)	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400047758</a>	0	391	173(D)	-	47-334	53-61	75	7	N	N
<a href="#">PGSC0003DMP400033480</a>	0	430	236(D)	-	112-379	118-126	140	7	N	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400022995</a>	0	630	465(D)	-	341-618	347-355	369	9	Y(27▼28)	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400035792</a>	0	932	712(D)	-	583-863	589-597	611	9	Y(25▼26)	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400001272</a>	0	367	166(D)	-	40-320	46-54	68	3	N	N
<a href="#">PGSC0003DMP400049978</a>	0	938	714(D)	-	585-865	591-599	613	11	Y(26▼27)	Y(2)
<a href="#">PGSC0003DMP400004649</a>	0	789	631(D)	-	508-779	514-522	535	3	Y(19▼20)	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400032008</a>	0	792	631(D)	-	503-781	509-517	531	7	Y(28▼29)	Y(1)
<a href="#">PGSC0003DMP400015669</a>	0	416	211(D)	-	76-361	82-90	114	9	N	N

#LysM: Lys Motif; #AS: Active site; LMP:LysM position ; PKP:Protein kinase position; NP\_ATP: nucleotide phosphate

binding regions;ATPB:ATP- Binding position; #Chro: Chromosome number; SP: Signal Peptide; TM: Transmembrane Domain



همه ۳۵ گیرنده کاینازی دارای یک دمین کاتالیتیکی (Ser/Thr) بودند (جدول ۲).

### چندشکلی در موتیف LysM

برخی از جهش‌ها در نواحی کد کننده‌ی ژن‌ها قادرند فعالیت پروتئین را تحت تاثیر قرار دهند. از این‌رو، گاهی تفاوت دو رقم حساس و مقاوم به یک تنش زیستی یا غیر زیستی می‌تواند ناشی از بروز جهش در یک یا چند ژن کد کننده‌ی صفت مورد نظر باشد (Jones and Dangl (2006). یکی از راهکارهای شناسایی این قبیل از جهش‌ها، شناسایی ژن یا ژن‌های کنترل کننده‌ی این قبیل صفات، توالی‌یابی کل ژن یا مهمترین دمین‌های مسول فعالیت این قبیل از پروتئین‌هاست. چون کیتین یکی از مولکول‌هایی است که از طریق موتیف LysM به گیرنده‌های کاینازی متصل می‌شود، از این‌رو توالی این موتیف در نزدیکترین گیرنده‌های کاینازی سیب زمینی به CERK1 گیاه آرابیدوپسیس و در رقم روزت بوربنک و ژنوتیپ F06037 مورد بررسی قرار گرفت. هیچ تفاوتی در توالی موتیف‌های هر پروتئین نسبت به همان موتیف‌ها در دو رقم از نظر هر دو پروتئین مشاهده نشد (شکل ۲). با این حال، توالی موتیف لیزین دو پروتئین با یکدیگر متفاوت بودند.

تنها دارای یک دمین کاینازی است (جدول ۲). از بین ۳۵ پروتئین RKs/RLKs ژنوم سیب زمینی، هیچ یک بیش از دو موتیف لیزین نداشتند (جدول ۲). با این حال، مطالعه در سایر موجودات و پروتئین‌های مربوطه نشان داده است که تعداد موتیف لیزین بسته به نوع پروتئین از یک تا ۱۲ عدد متغیر است. همچنین در تمام پروتئین‌های RLK ژنوم سیب زمینی، موتیف لیزین تنها در انتهای N پروتئین حضور داشت، این در حالی است که در سایر موجودات زنده ممکن است این موتیف در برخی پروتئین‌ها در انتهای N، در برخی دیگر در انتهای C یا حتی در میانه پروتئین در حد فاصل دو دمین دیگر قرار داشته باشند (Buist et al., 2008).

دمین‌های تشکیل دهنده‌ی همه ۳۵ گیرنده‌ی کاینازی ژنوم سیب زمینی توسط الگوریتم‌های SMART، CDD و Prosite مورد بررسی قرار گرفتند (Letunic et al., 2014). با توجه به اهمیت دمین خارج سلولی در سیستم مقاومت به پاتوژن‌ها، بر این اساس این پروتئین‌ها به دو گروه دارای دمین خارج سلولی (۹ پروتئین) و فاقد دمین خارج سلولی (۲۶ پروتئین) تقسیم شدند. از بین پروتئین‌های دارای دمین خارج سلولی، پنج و چهار پروتئین به ترتیب دارای یک و دو موتیف تخصصی اتصال به کیتین (LysM) بودند.

```

1331-RB-1 : ASFYVWRGNSLTLISEMFSTSIPIDIVSYNMRDNIENQDSVIAGTRINI--- : 48
1331-37-1 : ASFYVWRGNSLTLISEMFSTSIPIDIVSYNMRDNIENQDSVIAGTRINI--- : 48
1331-RB-2 : VTYPVRAEDNLTSSVASAANVSEDIIRRYN-----PAAESILDIGEGIIY-- : 44
1331-37-2 : VTYPVRAEDNLTSSVASAANVSEDIIRRYN-----PAAESILDIGEGIIY-- : 44
0418-RB   : LTYLIASGEFVSFISDKFGVDFRATLAAN---SIPEDAPTVPNTTLLV-- : 46
0418-37   : LTYLIASGEFVSFISDKFGVDFRATLAAN---SIPEDAPTVPNTTLLV-- : 46
AtLysM    : VTYPLRPEDSLSSLARSSGVSADILQRYN-----PGVN--FNSNGNIVYVP : 44

```

شکل ۱- هم‌ردیفی چندگانه (MSA) بین موتیف‌های LysM دو پروتئین (1331) PGSC0003DMP400061331 و (0418) PGSC0003DMP400060418 در دو رقم روزت بوربنک (RB) و (37) F03067 با موتیف پروتئین CERK1 گیاه آرابیدوپسیس (AB367524). برای ترسیم هم‌ردیفی از نرم افزار CLUSTALW و با استفاده از پارامترهای پیش فرض برنامه انجام شده است.

**Figure 2. Multiple sequence alignment (MSA) of LysM motifs of PGSC0003DMP400061331 (1331) and PGSC0003DMP400060418 (0418) proteins from Russet Burbank (RB) and F03067 (37) cultivars with that of AtCERK 1 (AB367524). CLUSTALW with default setting was used to build the MSA.**

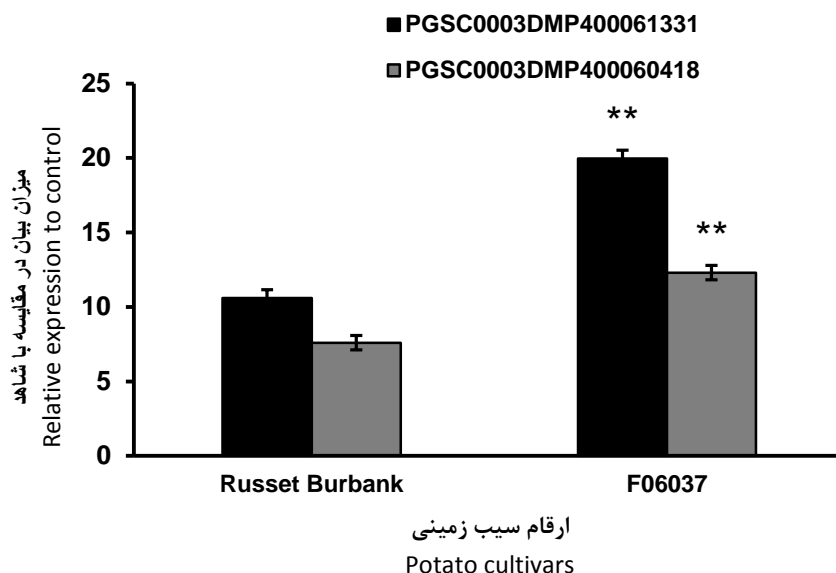
همردیفی موتیف‌های لیزین این دو پروتئین نشان داد که یک توالی سه اسید آمینه‌ای "NRD" در پروتئین PGSC0003DMP400060418 در مقایسه با پروتئین PGSC0003DMP400061331 در هر دو موتیف لیزین وجود ندارد. همانطوری که ملاحظه می‌شود، موتیف لیزین در همه پروتئین‌های همردیفی شکل ۲ در نیمه اول توالی نسبت به انتهای توالی بیشتر حفظ شده است.

### تغییرات بیان LysM-RLKs

با توجه به آنکه قارچ *A. solani* دارای کیتین در دیواره‌ی سلولی خود است و کیتین و اجزای تشکیل دهنده‌ی آن از جمله الیسیتورهای تحریک سیستم ایمنی گیاه محسوب می‌شوند، از این‌رو میزان بیان ژن‌های مرتبط به تحریک سیستم ایمنی از جمله دو ژن PGSC0003DMP400060418 و PGSC0003DMP400061331 به کمک Real Time-RT-PCR مورد مقایسه قرار گرفت. شکل ۳ تغییرات بیان این دو ژن را در مقایسه با شاهد نشان می‌دهد. میزان بیان هر دو ژن پس از آلودگی توسط قارچ به طور معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) بالا رفت. تغییر میزان بیان در رقم F06037 در هر دو ژن بالاتر از تغییر بیان در رقم روزت بوربنک بود. همچنین ژن PGSC0003DMP400061331 بیان بیشتر و معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) نسبت به ژن PGSC0003DMP400060418 نشان داد. چنین افزایشی در میزان بیان ژن‌های همولوگ با ژن CERK1 آرابیدوپسیس قابل انتظار بود (Miya et al., 2007; Wang et al., 2017). اختلاف میزان بیان دو ژن را شاید بتوان به تعداد موتیف‌های لیزین آنها مرتبط دانست، زیرا در آرابیدوپسیس مشخص شده است که موتیف‌های لیزین پشت سر هم برای فعالیت کامل پروتئین ضروری هستند و جهش در برخی از این موتیف‌ها یا حذف آنها سبب کاهش فعالیت کل پروتئین به دلیل کاهش تمایل پروتئین‌ها برای اتصال به کیتین است (Petutschnig et al., 2010).

همانطوری که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، توالی هر دو موتیف LysM پروتئین PGSC0003DMP400061331 و همچنین تنها موتیف LysM پروتئین PGSC0003DMP400060418 با توالی همین موتیف در گیاه آرابیدوپسیس متفاوت هستند. توالی موتیف LysM2 در پروتئین PGSC0003DMP400061331 هر دو رقم سیب زمینی با توالی تنها LysM آرابیدوپسیس شباهت فراوانی داشت و اکثر اسیدهای آمینه مهم آنها حفظ شده بود. همردیفی موتیف‌های LysM نشان داد که میزان همسانی در طول یک ناحیه‌ی ۳۰ اسید آمینه‌ای بیش از ۶۵ درصد بود (شکل ۲). این میزان شباهت دلیل قانع کننده‌ای برای همولوگ بودن آنها و همچنین نقش یکسان آنها در سیستم دفاعی میزبان است. چنین شباهت بالایی نیز در موتیف لیزین بسیاری از پروتئین‌ها به اثبات رسیده است (Buist et al., 2008). در صورتی که گیرنده‌های کاینازی دارای بیش از یک موتیف LysM باشند، در توالی بین دو موتیف یک توالی حفظ شده CXC وجود دارد (Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003; Buist et al., 2008) که به نظر می‌رسد با تشکیل پل دی سولفیدی به هر دو موتیف کمک می‌کند که به لیگاند مربوطه متصل شوند (Petutschnig et al., 2010). تعداد دو و یک توالی CXC در بین موتیف‌های لیزین در توالی LysM-RLKs سیب زمینی وجود داشت.

در بین ۳۵ پروتئین RKs/RLKs ژنوم سیب زمینی، هیچ یک دارای موتیف LysM در انتهای C پروتئین نبودند (جدول ۲). این در حالی است که موتیف لیزین در موقعیت‌های مختلفی در پروتئین‌های متفاوت دیده می‌شود (Buist et al., 2008). در این مطالعه، توالی دو پروتئین RLK سیب زمینی در دو رقم مقاوم و حساس از نظر تعداد موتیف لیزین متفاوت بودند. پروتئین PGSC0003DMP400061331 دارای دو موتیف لیزین، در حالی که پروتئین PGSC0003DMP400060418 دارای یک موتیف لیزین در دمین خارج سلولی خود بودند (شکل ۱).



شکل ۲- بیان دو ژن *LysM-RLKs* سیب زمینی پس از آلودگی با *A. solani*. میزان بیان در مقایسه با شاهد های موسوم به *Mock* سنجیده شده است. میانگین تغییرات بیان بر حسب *Ct* با استفاده از آزمون *t* در سطح احتمال یک درصد با هم مقایسه شدند. در این آزمایش از ژن *elf-1a* به عنوان ژن رفرنس برای نرمال سازی داده ها استفاده شد. \*\*: معنی دار در سطح احتمال یک درصد.

**Figure 3. Expression analysis of two *LysM-RLKs* following *A.solani* inoculation in potato. The expression level was measured relative to the corresponding mocks. Expression mean changes based on *Ct* values were compared at  $P<0.01$ . *elf-1a* was used to normalize the expression data. \*\*:Significant at  $P<0.01$ .**

افزایش پیدا نمود. این موضوع می تواند به دلایل زیر اتفاق افتاده باشد: (۱) حساسیت یا مقاومت به قارچ *A. solani* توسط ژن های دیگری کنترل می شود که ارتباطی با گیرنده های کاینازی ندارند. (۲) قارچ *A. solani* دارای افکتورهای خاصی است که مانع شروع و راه اندازی آبشار القا سیستم ایمنی گیاه می شود و (۳) مولکول های دیگری به عنوان ایسیتور در القا سایر پروتئین ها دخالت دارند که احتمالاً در ارتباط با قارچ *A. solani* نیستند. از این رو استفاده از ایزوله دیگری از این قارچ و قارچ های کیتین دار دیگر برای تلقیح و بررسی روند بیان می تواند در پاسخ به این موضوع اهمیت داشته باشد.

اگرچه در این مطالعه تفاوتی در توالی اسیدهای آمینه هر دو پروتئین *Lys-RLK* در هر دو رقم مشاهده نشد، اما این موضوع به این دلیل نیست که در این پروتئین ها جهش های موثری رخ نداده باشد که فعالیت پروتئین را تحت تاثیر قرار دهد، زیرا در این مطالعه تنها موتیف های *LysM* مورد بررسی قرار گرفته اند. از این رو لازم است در مطالعه ی دیگری دمین های کاتالیتیکی (Ser/Thr Kinase) آنها مورد مطالعه قرار گیرد تا بتوان با اطمینان بیشتری در این مورد صحبت نمود.

با وجود بررسی میزان بیان هر ۹ پروتئین *LysM-RLK* قبل و بعد از تلقیح با *A. solani*، تنها در دو پروتئین از خانواده *LysM-RLK* میزان بیان به شکل معنی دار

## منابع مورد استفاده

- Aalen RB, 2017. Plant Receptor Kinases: Methods and Protocols, Ed, Vol(1621), Springer Nature publishing.
- Arrighi J-F, Barre A, Amor BB, Bersoult A, Soriano LC, Mirabella R, de Carvalho-Niebel F, Journet E-P, Ghérardi M, Huguet T, 2006. The *Medicago truncatula* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant physiology* 142(1): 265-279.
- Bagherabadi S, Zafari D, Soleimani MJ, 2015. A report on the *Alternaria* species and its similar genera in Hamedan province. *Taxonomy and Biosystematics* 7(24):95-112.
- Beliveau C, Potvin C, Trudel J, Asselin A, Bellemare G, 1991. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of a *Streptococcus faecalis* autolysin. *Journal of Bacteriology* 173(18): 5619-5623.
- Bolton MD, van Esse HP, Vossen JH, de Jonge R, Stergiopoulos I, Stulemeijer IJ, van den Berg GC, Borrás-Hidalgo O, Dekker HL, de Koster CG, de Wit PJ, Joosten MH, Thomma BP, 2008. The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Mol Microbiol* 69(1): 119-136.
- Buist G, Steen A, Kok J, Kuipers OP, 2008. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido) glycans. *Molecular Microbiology* 68(4): 838-847.
- Carotenuto G, Chabaud M, Miyata K, Capozzi M, Takeda N, Kaku H, Shibuya N, Nakagawa T, Barker DG, Genre A, 2017. The rice LysM receptor-like kinase OsCERK1 is required for the perception of short-chain chitin oligomers in arbuscular mycorrhizal signaling. *New Phytologist* 214(4): 1440-1446.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD, 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic acids research* 31(13):3497-500.
- Conrath U, Linke C, Jeblick W, Geigenberger P, Quick WP, Neuhaus HE, 2003. Enhanced resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani* in leaves and tubers, respectively, of potato plants with decreased activity of the plastidic ATP/ADP transporter. *Planta* 217(1): 75-83.
- Corpet F, 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16(22): 10881-10890.
- Couto D, Zipfel C, 2016. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology* 16(9): 537.
- De Jonge R, Thomma BP, 2009. Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends in microbiology* 17(4): 151-157.
- Erwig J, Ghareeb H, Kopischke M, Hacke R, Matei A, Petutschnig E, Lipka V, 2017. Chitin-induced and Chitin Elicitor Receptor Kinase1 (CERK1) phosphorylation-dependent endocytosis of *Arabidopsis thaliana* Lysin Motif-Containing Receptor-Like Kinase5 (LYK5). *New Phytologist* 215(1): 382-396.
- Espinoza C, Liang Y, Stacey G, 2017. Chitin receptor CERK1 links salt stress and chitin-triggered innate immunity in Arabidopsis. *The Plant Journal* 89(5): 984-995.

- Garvey KJ, Saedi MS, Ito J, 1986. Nucleotide sequence of Bacillus phage Ø29 genes 14 and 15: homology of gene 15 with other phage lysozymes. *Nucleic Acids Research* 14(24): 10001-10008.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Ed, Vol 41. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
- Jones JD, Dangl JL, 2006. The plant immune system. *Nature* 444(7117): 323.
- Letunic I, Doerks T, Bork P, 2014. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Research* 43(D1): D257-D260.
- Lin W, Lu D, Gao X, Jiang S, Ma X, Wang Z, Mengiste T, He P, Shan L, 2013. Inverse modulation of plant immune and brassinosteroid signaling pathways by the receptor-like cytoplasmic kinase BIK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(29): 12114-12119.
- Liu Z, Wu Y, Yang F, Zhang Y, Chen S, Xie Q, Tian X, Zhou J-M, 2013. BIK1 interacts with PEPRs to mediate ethylene-induced immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(15): 6205-6210.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods* 25(4): 402-408.
- Macho AP, Zipfel C, 2014. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular Cell* 54(2): 263-272.
- Madsen EB, Madsen LH, Radutoiu S, Olbryt M, Rakwalska M, Szczyglowski K, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, 2003. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425(6958): 637.
- Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, He J, Lanczycki CJ, Lu S, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, 2016. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Research* 45(D1): D200-D203.
- Mélida H, Sopena-Torres S, Bacete L, Garrido-Arandia M, Jordá L, López G, Muñoz-Barrios A, Pacios LF, Molina A, 2018. Non-branched  $\beta$ -1, 3-glucan oligosaccharides trigger immune responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 93(1): 34-49.
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N, 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(49): 19613-19618.
- Narusaka Y, Shinya T, Narusaka M, Motoyama N, Shimada H, Murakami K, Shibuya N, 2013. Presence of LYM2 dependent but CERK1 independent disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 8(9): e25345.
- Nicot N, Hausman J-F, Hoffmann L, Evers D, 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of experimental botany* 56(421): 2907-2914.
- Pasche J, Piche L, Gudmestad N, 2005. Effect of the F129L mutation in *Alternaria solani* on fungicides affecting mitochondrial respiration. *Plant Disease* 89(3): 269-278.
- Petutschnig EK, Jones AM, Serazetdinova L, Lipka U, Lipka V, 2010. The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in

- Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 285(37): 28902-28911.
- Petutschnig EK, Stolze M, Lipka U, Kopischke M, Horlacher J, Valerius O, Rozhon W, Gust AA, Kemmerling B, Poppenberger B, Braus GH, Nurnberger T, Lipka V, 2014. A novel *Arabidopsis* CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1 (CERK1) mutant with enhanced pathogen-induced cell death and altered receptor processing. *New Phytol* 204(4): 955-967.
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Grønlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425(6958): 585.
- Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y, 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* 24(5): 981-990.
- Schultz J, Copley RR, Doerks T, Ponting CP, Bork P, 2000. SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Research* 28(1): 231-234.
- Shimizu T, Nakano T, Takamizawa D, Desaki Y, Ishii-Minami N, Nishizawa Y, Minami E, Okada K, Yamane H, Kaku H, Shibuya N, 2010. Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant J* 64(2): 204-214.
- Shinya T, Yamaguchi K, Desaki Y, Yamada K, Narisawa T, Kobayashi Y, Maeda K, Suzuki M, Tanimoto T, Takeda J, 2014. Selective regulation of the chitin-induced defense response by the *Arabidopsis* receptor-like cytoplasmic kinase PBL27. *The Plant Journal* 79(1): 56-66.
- Shiu S-H, Bleecker AB, 2001a. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci stke* 113(113): re22.
- Shiu S-H, Bleecker AB, 2001b. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(19): 10763-10768.
- Shiu S-H, Bleecker AB, 2003. Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 132(2): 530-543.
- Sigrist CJ, De Castro E, Cerutti L, Cuche BA, Hulo N, Bridge A, Bougueleret L, Xenarios I, 2012. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Research* 41(D1): D344-D347.
- Tanaka K, Nguyen CT, Liang Y, Cao Y, Stacey G, 2013. Role of LysM receptors in chitin-triggered plant innate immunity. *Plant Signal Behav* 8(1): e22598.
- Torii KU, 2009. Transmembrane receptors in plants: receptor kinases and their ligands. *Annu Plant Rev* 33:1-29.
- Tsedaley B, 2014. Review on early blight (*Alternaria* spp.) of potato disease and its management options. *J Biol Agric Healthc* 4: 191-198.
- Van der Waals JE, Korsten L, Slippers B, 2004. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. *Plant Disease*,88(9):959-64.
- Wang C, Wang G, Zhang C, Zhu P, Dai H, Yu N, He Z, Xu L, Wang E, 2017. OsCERK1-Mediated Chitin Perception and Immune Signaling Requires Receptor-like Cytoplasmic Kinase 185 to Activate an MAPK Cascade in Rice. *Mol Plant* 10(4): 619-633.

Zhou X, Wang J, Peng C, Zhu X, Yin J, Li W, He M, Wang J, Chern M, Yuan C, 2016. Four receptor-like cytoplasmic kinases regulate development and immunity in rice. *Plant, cell & environment* 39(6): 1381-1392.

Zipfel C, 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 20(1):10-16.

## Polymorphism and Expression Analysis of two Potato Receptor Genes (LysM-RLKs), Following *Alternaria solani* Infection

F Nazarian-Firouzabadi<sup>1\*</sup> and A Kushalappa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Iran.

<sup>2</sup> Department of Plant Science, McGill University, Ste. Anne de Bellevue, Quebec, Canada.

\*Corresponding Author: Nazarian.f@lu.ac.ir

Received: 25 February 2018

Accepted: 9 June 2019

### Abstract

The Lysin motif in receptor-like kinases (LysM-RLKs) bind to chitin or chitin components of the fungal pathogen cell wall to perceive their invasion. To study the LysM-RLK domains of potato genome involved in *Alternaria solani* response, the putative LysM-RLKs were bioinformatically assessed, sequenced and their expression levels were measured in a susceptible (Russet Burbank) and relatively resistant (F06037) genotypes, following inoculation of the pathogen. A total of 35 putative LysM-RLKs were detected in potato genome, of which 26, 5 and 4 LysM-RLK had none, one and two LysM motifs, respectively. Among 9 receptors containing LysM-RLK domains, two proteins showed a significant overexpression following *A. solani* infection.

PGSC0003DMP400061331 protein with two LysM motifs had a higher expression level than PGSC0003DMP400060418 protein with one LysM motif. Both proteins had 98% and 81% coverage with *Arabidopsis thaliana* CERK1 protein, respectively. Multiple sequence alignment (MSA) of LysM motifs from both proteins of two potato genotypes with that of *Arabidopsis thaliana* CERK1 revealed no difference between genotypes with respect to LysM motif sequence. Interestingly, the LysM motifs from PGSC0003DMP400061331 protein had an “NRD” insertion as compared to its second LysM motif, PGSC0003DMP400060418, and *Arabidopsis thaliana* CERK1 LysM motifs. Such changes may have occurred through deletions or duplications. Alteration of DNA sequences by genome editing methods may shed light on the role of these genes in the field of resistance or susceptibility to *A. solani* leading to generation of resistant transgenic plants to devastating fungal diseases.

**Keywords:** Chitin, Genome editing, Innate immunity, Receptor Like Kinases, Sequencing