

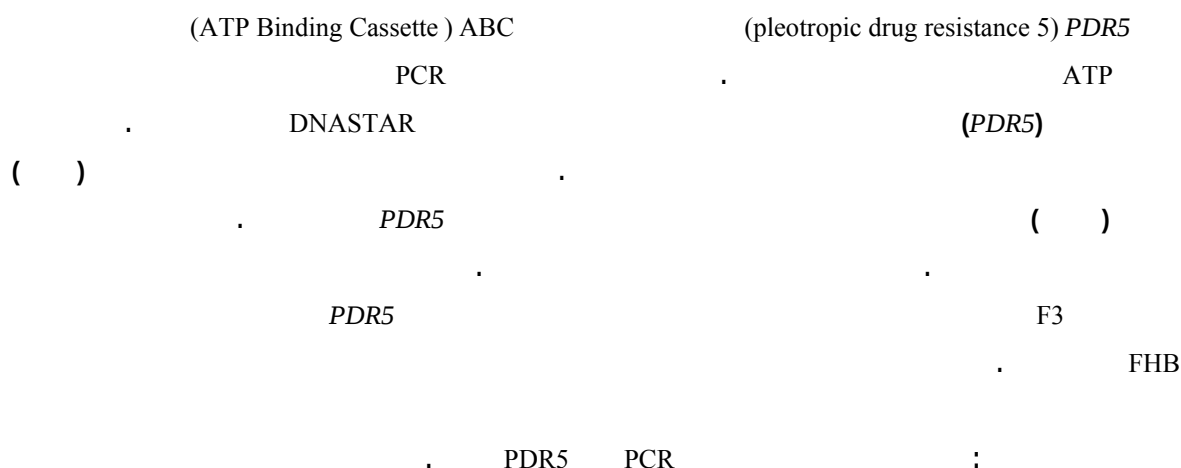
PCR

(PDR5)

Development of PCR based marker for candidate *Fusarium* head blight resistance gene (PDR5) in wheat

فروه احیا^۱، محمدرضا غفاری^۲، محسن مردی^۳، صبوران ظاهری^۴، بهزاد قره‌یاضی^۵

۱. ایجاد نشانگر مبتنی بر PCR براساس ژن کاندیدای مقاومت به پلاست فوزاریومی سنبله (PDR5) در گندم. مجله علوم زراعی ایران. جلد ۶، شماره ۴، صفحه ۳۹۵-۴۰۱.



می‌رود. از لحاظ ساختار پروتئینی، ناقلین ABC دارای دو رونوشت از دو واحد ساختمانی شامل یک ناحیه تراغشایی بسیار آبگریز TMD (Transmembran domain) و یک ناحیه متصل شونده به ATP یا مارپیچ متصل شونده به نوکلئوتید NBF (Nucleotide binding factor) هستند. در ناحیه NBF، دو ناحیه محافظت شده به طول ۲۰۰ اسید آمینه شامل نواحی Walker A، Walker B و علامت مشخصه ABC (ABC signature) وجود دارد که این نواحی در بین گونه‌های مختلف یوکاریوتی و پروکاریوتی حفظ شده است. بر اساس توپولوژی ترتیب

ناقلین ABC (ATP Binding Cassette) از بزرگترین خانواده‌های پروتئینی شناخته شده هستند که در تمام گونه‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی یافت می‌شوند (Henikoff et al., 1997). تمام پروتئین‌های این خانواده در انتقال فعال ترکیبات مختلف نقش داشته و از هیدرولیز ATP به عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند (Higgins, 1992). خروج سموم سلولی از طریق انتقال غشایی یا انتقال بین سلولی، انتقال از سیتوپلاسم به داخل واکوئل و جابجایی لپید از نقش‌های ناقلین ABC به‌شمار

تاریخ دریافت: ۱۳۸۳/۵/۷

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، مربی، استادیار، دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

مایکوتوکسین در گندم (Mesterhazy, 1995)، این تحقیق به منظور ایجاد نشانگر مبتنی بر PCR براساس ژن کاندیدای مقاومت به بلایت فوزاریومی سنبله (*PDR5*) به منظور بررسی نقش ژن *PDR5* در ایجاد مقاومت به FHB در گندم به اجرا در آمد.

ردیف‌های مشابه ژن *PDR5* در گونه‌های *Arabidopsis thaliana*، *Saccharomyces cerevisiae*، *Spirodela polyrhiza*، *S. bayanus*، *Oryza sativa* L.، *Nicotiana tabacum* و *N. plumbaginifolia* با کمک نرم افزار DNASTAR هم ردیف شدند (شکل ۱). سی جفت آغازگر بر اساس نواحی حفظ شده و غیرحفظ شده طراحی شدند. استخراج دی. ان. ا از والدین حساس (فلات)، نیمه مقاوم (فرونتانا)، مقاوم (سوماپتری و ونگشوبای) به FHB و ۱۴۰ گیاه $F_{3:4}$ حاصل از تلاقی فرونتانا در فلات طبق روش سقائی معروف و همکاران (Saghaie et al., 1984) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (۱/۹۸ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۱ میلی مولار از هر یک داکسی نوکلئوتید تری فسفات‌ها، ۶۰ نانو گرم از هر یک از آغازگرهای Forward و Reverse، یک واحد آنزیم تک دی. ان. ا پلی مراز، ۵۰ تا ۱۰۰ نانو گرم دی. ان. ا الگو و برنامه تکثیر ۳ دقیقه $94^{\circ}C$ ، ۴۰ سیکل شامل ۱ دقیقه $94^{\circ}C$ ، یک دقیقه و ۳۰ ثانیه $55^{\circ}C$ ، سه دقیقه $72^{\circ}C$ و پس از پایان ۴۰ سیکل ۵ دقیقه $72^{\circ}C$)، با استفاده از توالی آغازگرهای طراحی شده و دی. ان. ا والدین فلات، سوماپتری، ونگشوبای و فرونتانا به منظور شناسایی آغازگرهای چندشکل در بین والدین انجام شد. قطعه تکثیر شده چند شکل پس از استحصال از ژل آگارز تخلیص و طبق روش کیت همسانه سازی PGEM-T Easy vector (Promega Cat.#A1360) همسانه و ردیف‌یابی شد. صحت ردیف‌یابی با استفاده از همولوگ‌های ژن *PDR5* در گونه‌های نزدیک به گندم مانند برنج و ذرت به وسیله برنامه BLAST در بانک ژنی

قرارگیری نواحی TMD و NBF، ناقلین ABC درسه گروه MRP (Human multiple drug resistance)، MDR (Multi drug resistance)، و PDR (Pleotropic drug resistance) تقسیم‌بندی می‌شوند که *PDR5* یکی از زیر گروه‌های PDR است (Higgins, 1992; Bungert et al., 2001).

آدام و لیمنز (Adam and Lemmens, 1996) با مطالعه بر روی مخمر نشان دادند که مقاومت به مایکوتوکسین به وسیله ژن‌های ناقلین پروتئینی ABC قبیل *PDR5* ایجاد می‌شود. میتربایر و آدام (Mitterbauer and Adam, 2002) با مطالعه بر روی موتانت‌های فاقد ژن *PDR5* در مخمر گزارش کردند که این موتانت‌ها نسبت به مایکوتوکسین‌های مختلف حساسیت داشتند. تاکنون ایزوفورم‌های مختلفی از ژن‌های PDR از آراییدوپسیس جداسازی شده‌اند (Van der Brule and Smart, 2002). در برنج پیش‌بینی می‌شود حدود ۲۵ ایزوفورم از ژن‌های PDR وجود داشته باشد (Jasinski et al., 2001). تا کنون گزارشی از جداسازی ژن *PDR5* گندم گزارش نشده است.

بلایت فوزاریومی سنبله گندم یا FHB (*Fusarium Head Blight*) که توسط گونه‌های مختلف قارچ فوزاریوم (*Fusarium spp.*) ایجاد می‌شود، یکی از بیماری‌های مهم گندم در مناطق گرم و مرطوب جهان به شمار می‌آید. این بیماری باعث کاهش شدید عملکرد و افت کیفیت دانه می‌شود (Mardi et al., 2002). مایکوتوکسین‌های تولید شده توسط عامل بیماری مانند DON (Deoxynivalenol) باعث ایجاد مسمومیت‌های شدید در انسان و دام می‌شود. مسترهازی (Mesterhazy, 1989) و لیو و وانگ (Liu and Wang, 1991) با مطالعه بروی لاین‌های فرونتانا نشان دادند که قدرت تجزیه DON و یا جلوگیری از سنتز آن از مکانیزم‌های مقاومت گندم به FHB به شمار می‌رود. با مشخص شدن نقش *PDR5* در سم‌زدایی مایکوتوکسین‌ها از سلول و وجود مکانیزم تحمل به

* * . * ..* . ..** * .* **.. ... *

.

. . * . . . ** . * * * . . * * . * * * . . *

, *. . . *, . ***... * ...

• •

..**.* ** *

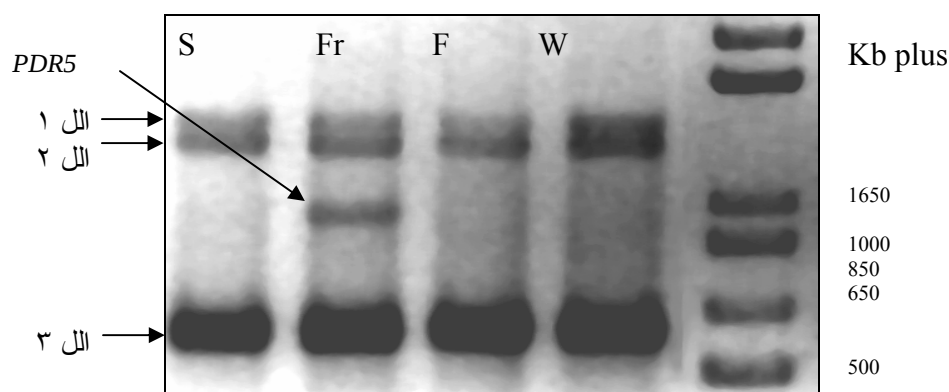
..*.*.*.*.*.*.*.*.*.*..* . . *....*

۳۹۷

کنترل کننده مقاومت به بلایت فوزاریومی سنبه گندم در والدین مقاوم چینی (سومايتری و ونگشوبای) با والدین مقاوم برزیلی (فرونتانا) متفاوت است. ردیف باند اختصاصی والد نیمه مقاوم به وسیله آغازگرهای PR و PF در شکل ۴ نشان داده شده است. ردیف های قطعه چند شکل تکثیر شده با همولوگ های ژن *PDR5* در گونه های نزدیک به گندم مانند برنج و ذرت، ۷۵ تا ۸۰ درصد شباهت داشتند و صحت جداسازی را تأیید کرد (نتایج نشان داده نشده است). نتایج این تحقیق نشان داد که ال های مختلفی از ژن *PDR5* در گندم وجود دارد (شکل ۲ و ۳). میتربایر و آدام (Mitterbauer and Adam, 2002) و وندر برول و اسمارت (Van der Brule and Smart, 2002) ۱۵ ایزوform از ژن های PDR را در *Arabidopsis thaliana* تعیین مشخصات نمودند. تجزیه تک نشانگری نشان دهنده اثر منفی و معنی دار این ال اختصاصی ژن *PDR5* بر میزان آلودگی به فوزاریوم بود (جدول ۱). مدل رگرسیونی برازش شده $AUDPC = -0.82 (PDR5 \text{ specific allele}) + 4.10$ ($P > 0.057$) نشان داد که این ال حدود ۴ درصد از تغییرات AUDPC را با اثر منفی توجیه نمود.

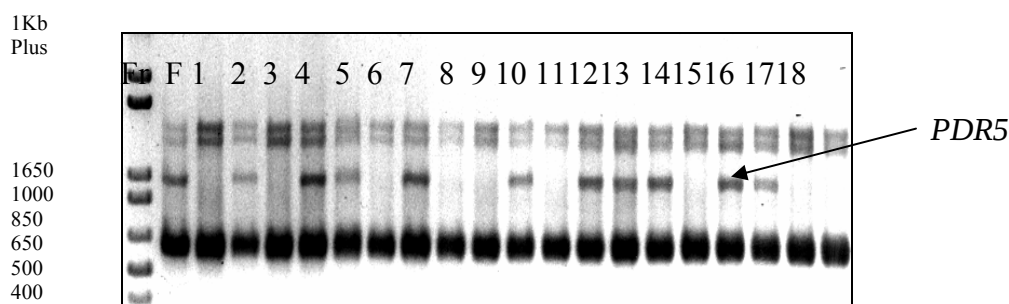
مورد بررسی قرار گرفت (NCBI). اختصاصی بودن ال ژن *PDR5* در والد فرونتانا بوسیله واکنش زنجیره ای پلیمراز آغازگرهای اختصاصی این ال در والدین مقاوم سومايتری و ونگشوبای بررسی شد. اثر ال اختصاصی ژن *PDR5* در مقاومت به FHB در گندم به وسیله تجزیه تک نشانگری (Single marker analysis) و استفاده از سطح زیر منحنی پیشرفت آلودگی یا AUDPC (Area under the disease progress curve) ۱۴۰ گیاه $F_{3:4}$ آلوده شده با *F. graminearum* طبق روش مردی و همکاران (Mardi et al., 2002) ارزیابی شد.

از مجموع ۳۰ جفت آغازگر طراحی شده، ۲۹ جفت آغازگر باند یک شکل در والد حساس و نیمه مقاوم و یک جفت آغازگر (PR و PF) باند اختصاصی در والد نیمه مقاوم ایجاد کرد (شکل ۲ و ۳). عدم مشاهده ال اختصاصی ژن *PDR5* در والدین مقاوم سومايتری و ونگشوبای نشان دهنده اختصاصی بودن این ال در والد نیمه مقاوم فرونتانا است. مردی و همکاران (Mardi et al., 2004) گزارش کردند که ژن های



شکل ۲- ال اختصاصی ژن *PDR5* در والد نیمه مقاوم فرونتانا (Fr). (والدین مقاوم سومايتری (S)، ونگشوبای (W) و حساس فلات (F) فاقد این ال بودند)

Fig. 2. *PDR5* specific allele in moderately resistant parent Frontana (Fr). (Lack of specific allele in resistant parents Sumai#3(S), Wangshuibai (W) and susceptible parent Falat (F)



شکل ۳- الی اختصاصی ژن *PDR5* در والد نیمه مقاوم فرونتانا (Fr) و تعدادی از $F_3:4$ حاصل از تلاقی فلات / فرونتانا (F = فلات)

Fig. 2. *PDR5* specific allele in moderately resistant parent Frontana (Fr) and some $F_3:4$ plants developed from a cross Falat / Frontana (F= Falat)

PF
→

5'-CTCTTCACCATCGTCATTGCGTTCATGATATCATTGAGGATCCTTGATATT
TCCAATATATTCATGCATTAAACCAGGGCGGCGGCTTAAAGGCAGGATACCCCAA
GAAACCCAGCAGCGGATGAGATCAATGCCGGTCAAACCGTTGGCTAGGAGAGCA
CGGAGCTTGGCGAGTTGAGGGGTATAAGTTTGCCGTTCTTTGGGAGTTGAACGTT
GAGGTAACGGATGGCCATTGCTAAGCCGGTGAGGGCGGTAACCGGACAAAGGAT
TTTCTCCAGTAGGGGCAGTATTCTGACAATAAAACCATGTTTGGTTCCAATCTTTG
GGATGACTGTGGTGTCTGTCATGAGGGAAATCAACTTCTTTTCTCTTCTGGATTGA
GACCCACCAAGTTCCATGTTGGGACCATCAGAGAACTCAGTGCGGCGGTTTAAA
TGGAATAATCCCGAAAAAGCTCCACAGATGGTTCTTATTGAAGGTAAACTTCAC
AGAACACTTGAAAATTGCATATATTGGACACGGAGTTCAGTCCAATATCCTGTGC
ATGGAGTTGAAAGCTCGCAAGGACATCCCGAAATTTTTTTGATCCGGGAGGGATG
AATCCCCGGTCTAAGTGTTCATAAATATAATCACCTCTCCATCCTGAGGCTCAG
GAGGGCACTCAGGGCCAGGGACTCGCCAATGAAGGACCtTTTTAGgCTAGAGCG
CCAGTGGTAACATATCCATTGATCTACGTTTTTCGTGATCCGGGACAgAACCCAGTT
GCAAGCGGAGAATTGTTTGGTCATCTTGGACAACAACTGTAAAGGTAAAACGA
AGGCCGGTTTACGATTGACGGTTCAGGTGTACTAATTGGTGTCAACCCGGGGAAT
TTGATCAAAGCATATATGTGAGATAAACCGGAAATTGCTATTCAAATCAAGATGG
TAGTTTAAGTGAGGGCTAATGATATATGGCGGGCTAGTC-3'

←
PR

شکل ۴- قسمتی از ژن مشابه *PDR5* جداسازی شده از گندم. (آغاز گره های PR و PF با فلش مشخص شده اند)

Fig. 3. Partial sequence of *PDR5* homologous gene isolated from wheat.
(Arrows show the positions of PR and PF primers)

جدول ۱- تجزیه تک نشانگری الل اختصاصی ژن *PDR5* برای سطح زیر منحنی پیشرفت آلودگی (AUDPC) در نسل $F_{2:3}$ حاصل از تلاقی فلات × فرونتانا

Table 1. Single marker analysis of *PDR5* specific allele for area under the disease progress curve (AUDPC) in F_3 generation developed from a cross between Falat x Frontana

منبع تغییرات		درجه آزادی	میانگین مربعات	F	P-value	R ² تصحیح شده
S. O. V.		df	MS			Adjusted R ²
Model	مدل	1	18.37	3.68	0.057	4
Error	اشتباه	106	4.98			

مایکوتوکسین‌های تولید شده توسط گونه‌های مختلف فوزاریوم در گندم) محتمل دانست.

بیشتر هزینه‌های این تحقیق از محل اعتبارات پروژه همکاری مشترک بین دفتر همکاری‌های فناوری ریاست جمهوری و وزارت علوم و آموزش عالی اتریش تأمین شده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.

نتایج نشان داد که با توجه به ناچیز بودن سهم R^2 تصحیح شده این الل در توجیه واریانس AUDPC به نظر می‌رسد حداقل این ژن مشابه *PDR5* نقش تعیین‌کننده‌ای در ایجاد مقاومت ندارد ولی ممکن است در مجاورت ژن (هایی) باشد که دارای اثرهای جزئی در ایجاد مقاومت هستند. البته با توجه به وجود اثر منفی این الل در میزان آلودگی ($\beta = -0.82$) ممکن است بتوان نقش ژن *PDR5* در ایجاد مقاومت به FHB در گندم را نیز (احتمالاً از طریق مکانیزم تحمل به

References

- Adam, G. and M. Lemmens. 1996. Involvement of ABC transporter proteins in trichothecene resistance. Abstract B3, 8th IS-MPMI conference Knoxville, TN.
- Bungert, S., L.L. Molday and R.S. Molday. 2001. Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters. J. Biol. Chem. 276: 23539-23546.
- Henikoff, S., E. A. Green, S. Pietrokovski, P. Bork, T. E. Attweek and L. Hood. 1997. Genome families: the taxonomy of protein paralogs & chimeras. Sci. 278: 609-614.
- Higging, C. F. 1992. ABC-transporters: from microorganism to men. Ann. Rev. Cell. Bio. 8: 67-113.
- Jasinski, M., Y. Stukkens, H. Degand, B. Purnelle, J. Marchand-Brynaert and M. Boutry. 2001. A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. Plant. Cell. 13: 1095-1107.
- Liu Z. Z., AND Z. Y. Wang. 1991. Improved scab resistance in China: Sources of resistance and problems, IN: D.A.Saunders, ed., Wheat for the Nontraditional Warm Areas. Proc. Int. Conf., CIMMYT, Mexico, D.F., pp. 178-188.
- Mardi, M., B. Yazdisamadi, M. R. Ghanadha, B. Ghareyazie, A. R. Talei and H. Buerstmayr. 2002. Identification of DNA markers linked to QTL controlling *Fusarium* head blight resistance in common wheat. J. Appl. Genet. 43: 279-288.

- Mardi, M., H. Buerstmayr, B. Ghareyazie, M. Lemmens, S. A. Mohammadi, R. Nolz and P. Uckenbauer. 2005.** QTL analysis of resistance to *Fusarium* head blight in wheat using a 'Wangshuibai' derived population. Plant Breeding, (In press).
- Mestrhazy A. 1989.** Progress in breeding of wheat and corn genotypes not susceptible to infection by *Fusaria*. In: J. Chelkowski (ed.), *Fusarium-mycotoxins, Taxonomy, and Pathogenicity*, Elsevier, Amsterdam, pp. 357-386.
- Mesterhazy A. 1995.** Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. Plant Breed. 114: 377-386.
- Mitterbauer, R. and G. Adam. 2002.** *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*: useful model systems for the identification of molecular mechanisms involved in resistance of plant to toxins. Eur. J. Plant Path. 108: 699-703.
- National Center For Biotechnology Information. www.ncbi.nlm.nih.gov.
- Saghaie-Maroo, M. A., K. M. Sliman, R. A. Jorgensen and R. W. Allard. 1984.** Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. PNAS. 81: 8014-8018.
- Van Der Brules, CC. Smart. 2002.** The plant PDR family of ABC transporters. Planta. 216: 95-106.

Development of PCR based molecular marker for candidate *Fusarium* head blight Resistance gene (*PDR5*) in wheat

Ehya¹, F., M. R. Ghaffari², M. Mardi³, S. Zaheri⁴ and B. Ghareyazie^{*5}

ABSTRACT

The *PDR5* (pleiotropic drug resistance 5) gene, encoding ABC transporter protein, detoxifies cells using ATP hydrolysis. To develop PCR based marker for *Fusarium* head blight resistance candidate gene (*PDR5*) in wheat, similar sequences of *PDR5* were aligned with DNASTAR software. Primers were designed based on conserved and non conserved sequences. Molecular analysis using moderately resistant (Frontana) and susceptible (Falat) parental lines showed a specific *PDR5* allele in Frontana. Amplified allele was isolated, cloned and sequenced. The sequencing was verified on data Bank. Single marker analysis based on phenotyping and genotyping data of F₃ generation developed from a cross between Frontana and Falat indicated the specific *PDR5* allele had negative effect on FHB infection in wheat.

Key word: Wheat, *Fusarium* Head Blight, PCR, *PDR5* gene, Phenotyping, Genotyping.

Received: Aug, 2004

1, 2, 3, 4, 5- MSc. student, Lecturer, Assistant Prof., Research officer and Associate Prof., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran

* Corresponding author