"مجله علوم زراعی ایران"
جلد دوازدهم، شماره ۴ زمستان ۱۳۸۹

تغییرات ساختاری ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای Lr35 در ژنوتیپ های مقاوم و حساس گندم نان (*Triticum aestivum* L.)

Structural variation of leaf rust resistance gene Lr35 in resistant and susceptible bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes

رحیمه همتی گوگه[۱]، سید ابوالقاسم محمدی[۲] و سعید اهری‌زاد[۳]

چکیده

همتی گوگه، ر.، س. ا. محمدی و س. اهری زاد. ۱۳۸۹. تغییرات ساختاری ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای Lr35 در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس گندم نان (*Triticum aestivum* L.). **مجله علوم زراعی ایران. ۱۲ (۴) ۵۰۹-۴۹۹.**

زنگ قهوه‌ای از بیماری‌های مهم گندم است که باعث کاهش عملکرد آن می‌شود. تولید ارقام مقاوم یکی از راهکارهای اصلی کنترل بیماری زنگ گندم است. لازمه این عمل، شناخت ژنتیک مقاومت و ژن‌های مقاومت به بیماری است. در این مطالعه با استفاده از سه جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده براساس داده‌های موجود در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI)، قطعاتی بطول ۳۵۱-۳۴۰ جفت باز از ژن Lr35 تکثیر شد. قطعات پس از همسانه‌سازی، توالی‌یابی شدند. بلاست توالی قطعات تکثیری از ژن Lr35 در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، شباهت ۹۵ درصد با توالی ژن Lr35 گندم نان از NCBI نشان داد. علاوه بر این، توالی‌های حاصل دارای شباهت ۹۳ درصد با ژن Lr21 از کلون کاسمیدی ۱-۷-۶۹ *Aegilops tauschii*، ۸۷ درصد با ژن گلوتنین A با وزن مولکولی بالا از *Triticum turgidum*، ۸۴ درصد با ژن پلاستیدی‌استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز (Acc-1) از *T. turgidum* و ژن‌های مقاومت به سفیدک پودری و تحمل به سرمای گندم نان بود. توالی‌های تکثیری با استفاده از سه جفت آغازگر، دارای یک چارچوب قرائت آزاد، به‌ترتیب به‌طول ۱۶۲، ۱۵۶ و ۱۶۰ جفت‌باز بوده و پروتئین‌هایی بطول ۵۴، ۵۲ و ۵۴ اسیدآمینه رمز کردند. بررسی ساختار توالی‌ها نشان دهنده وجود ناحیه غنی از لوسین، از نواحی حفاظت شده در ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها در گیاهان بود. تجزیه خوشه‌ای براساس توالی قطعات تکثیری از ژن Lr35 با استفاده از جفت آغازگر دوم ژنوتیپ‌ها را براساس پاسخ به زنگ آن‌ها گروه بندی کرد. نسبت جایگزینی های نامشابه به مشابه نشان دهنده نقش احتمالی گزینش مثبت و یا گرینش ایجاد کننده تنوع در تغییرات نوکلئوتیدی این ژن بود. با توجه به وجود تفاوت‌های نوکلئوتیدی بین ژنوتیپ‌های مقاوم، نیمه مقاوم و حساس، می‌توان از آن ها برای طراحی آغازگرهای اختصاصی مبتنی بر SNPها جهت شناسایی ارقام حساس و مقاومت به زنگ قهوه‌ای در گندم استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: تنوع نوکلئوتیدی، جایگزینی مشابه، ژن‌های مقاومت به بیماری و گندم نان.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۸/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۵

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۲- استاد، قطب علمی اصلاح مولکولی غلات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: mohammadi@tabriz.ac.ir)
۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.10.3]

مقدمه

زنگ قهوه‌ای از بیماری‌های قارچی مهم گندم است که بیشترین پراکنش را در سطح جهان داشته و تولید آن را محدود می‌سازد. تولید گندم بدون استفاده از سموم قارچ‌کش به طور قابل توجهی بوسیله بیماری‌های زنگ غلات مخصوصاً زنگ قهوه‌ای محدود می‌شود که نتیجه آن کاهش عملکرد در سطح جهانی است. بنابراین، اصلاح برای مقاومت به زنگ ها یکی از اهداف اصلی برنامه‌های اصلاحی گندم در اغلب کشورها به شمار می‌رود (Feuillet *et al*., 2003).

تاکنون بیش از ۴۰ ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای در گندم شناسایی شده است (Knott, 1989; McIntosh, 1995; Xing *et al*., 2007) که بیشتر آن‌ها مقاومت در مرحله گیاهچه‌ای و تعدادی کمتر مقاومت در مرحله گیاه کامل را القاء می کنند. اکثر این ژن‌ها دارای توارث تک‌ژنی هستند، ولی برخی از آن‌ها مانند ژن *Lr34* مقاومت کمی را در مقابل این بیماری القاء می‌کنند (Drijepondt and Pretoriuse, 1989; German and Kolmer, 1992; Singh, 1992). از بین ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه ای شناسایی شده، دو ژن *Lr13* و *Lr35* واکنش فوق حساسیت را در پاسخ به نژادهای بیماری‌زای زنگ قهوه‌ای افزایش می‌دهند. ژن *Lr13* در اغلب ژنوتیپ‌های گندم وجود دارد و در ترکیب با سایر ژن‌ها باعث افزایش مقاومت می‌شود (McIntosh *et al*., 1995; Kolmer, 1997). کربر و دیک (Kerber and Dyck, 1990) با تلاقی بین‌گونه‌ای، ژن *Lr35* را از گونه وحشی و دیپلوئید خویشاوند گندم به کروموزوم 2B گندم منتقل کردند. این ژن مقاومت در مرحله بلوغ را ایجاد می‌کند و با ژن مقاومت به زنگ سیاه (*Sr39*) بطور همزمان تفکیک می‌شود (Gold *et al*., 1999).

ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها در گیاهان از نظر ساختاری به پنج گروه تقسیم می شوند که بزرگترین گروه از این ژن‌ها، پروتئین‌هایی با جایگاه حفاظت شده NBS–LRR را رمز می‌کنند (Huang *et al*., 2003). توالی‌یابی ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای *Lr1*، *Lr21* و *Lr10* نشان دهنده وجود ساختار NBS-LRR-CC در آن‌ها می‌باشد (Cloutier *et al*., 2007). جیانگ و همکاران (Jiang *et al*., 2007) با بررسی تنوع نوکلئوتیدی در ناحیه غنی از لوسین (LRR) ژن‌های مقاومت به بیماری ها گزارش کردند که میزان تنوع نوکلئوتیدی و نسبت جایگزینی‌های مشابه (Ks) به نامشابه (Ka) بطور معنی‌داری متفاوت می‌باشد. در ناحیه LRR چهار ژن *L*، *P*، *RPP13* و *RPP8*، Ks به طور معنی داری بیشتر از Ka بود که نشان می‌دهد ناحیه LRR در برخی از ژن‌های مقاومت تحت فشار گزینشی در جهت ایجاد تنوع قرار گرفته است. الیس و همکاران (Ellis *et al*., 1999) با هم ردیف کردن توالی‌های ۱۳ الل *L* که مقاومت به زنگ را در کتان القاء می‌کنند، نشان دادند که تفاوت بین الل‌ها می‌تواند به علت تغییرات در ناحیه LRR و TIR باشد. هم ردیفی توالی-های اسیدآمینه‌ای برای شناسایی نواحی حفاظت شده و نیز هم‌ردیفی توالی‌های DNA نشان دادند که تبادل قطعات در طول زمان تکاملی می‌تواند عامل ایجاد الل-های مختلف باشد.

هدف این آزمایش، تکثیر، جدا سازی و همسانه کردن بخش‌هایی از ژن *Lr35* با استفاده از سه جفت آغازگر اختصاصی، بررسی درجه شباهت آن با توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی و تعیین تنوع نوکلئوتیدی در ژنوتیپ‌های گندم با درجه متفاوت مقاومت به زنگ قهوه‌ای بوده است.

مواد و روش ها

مواد گیاهی شامل هفت ژنوتیپ گندم نان با درجات متفاوت مقاومت به زنگ قهوه‌ای در مرحله گیاهچه‌ای و گیاه کامل بودند که از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کشور تهیه شدند. پاسخ به زنگ این ژنوتیپ‌ها براساس مطالعات مختلف در بخش

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-29]

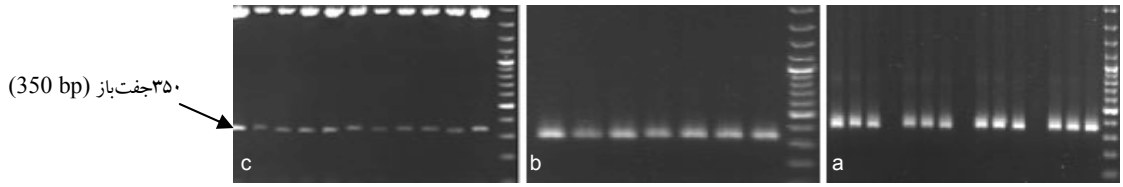
[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.10.3]

جدول ۱- ژنوتیپ‌های گندم نان مورد ارزیابی و پاسخ به زنگ قهوه‌ای آن‌ها در مرحله گیاهچه‌ای و گیاه کامل

Table 1. The studied bread wheat genotypes and their response to leaf rust at seedling and adult plant stages

ژنوتیپ‌های گندم Wheat genotypes	مرحله گیاهچه‌ای Seedling stage	مرحله گیاه کامل Adult stage
MV-17	حساس/نیمه حساس Susceptible/partially susceptible	مقاوم / نیمه مقاوم Resistant/partially resistant
بولانی Bolani	حساس Susceptible	حساس Susceptible
پیشتاز Pishtaz	حساس Susceptible	حساس – نیمه حساس Susceptible/partially susceptible
مغان۳ (N-80-6) Moghan3	حساس Susceptible	حساس – نیمه حساس Susceptible/partially susceptible
MKH3	مقاوم Resistant	نیمه مقاوم – نیمه حساس Partially resistant/partially susceptible
MKH4	حساس Susceptible	نیمه مقاوم – نیمه حساس Partially resistant/partially susceptible
بولوئیکا (بهار) (M-79-7) Boloeka	حساس Susceptible	نیمه مقاوم – نیمه حساس Partially resistant/partially susceptible

غلات، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تعیین گردیده است (جدول ۱). استخراج DNA ژنومی با روش CTAB (Saghai-Maroof *et al*., 1984) انجام و کمیت و کیفیت نمونه های DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد. برای تکثیر ژن *Lr35* از سه جفت آغازگر *Lr35*–1، *Lr35*–2 و *Lr35*–3 طراحی شده براساس توالی این ژن در NCBI استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر 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. غربال کلنی‌ها انجام و کلنی‌های سفید رنگ حاوی قطعات تکثیری برای استخراج پلاسمید انتخاب گردیدند. تهیه سلول‌های مستعد با استفاده از روش کوهن و همکاران (Cohen *et al*., 1972) انجام شد. استخراج پلاسمید براساس روش بیرنبوئیم و دالی (Birnboim and Doly, 1979) صورت گرفت و



شکل ۱- a: گرادیان دمایی برای تعیین دمای بهینه تکثیر ژن *Lr35*، b: الگوی نواری ژن *Lr35* در هفت ژنوتیپ گندم نان، c: الگوی نواری پلاسمیدهای برش‌یافته با آنزیم‌های *EcoRI* و *HindIII*. پلاسمید با طول ۲۸۸۶ جفت‌باز و قطعه درجی با طول ۳۵۱ جفت‌باز. اندازه نوارها با استفاده از نشانگر ۱۰۰ جفت‌باز تعیین شد.

Fig. 1. a: Gradient temperatures to determine optimal temperature for amplification of *Lr35* gene, b: Banding pattern of *Lr35* gene in seven wheat genotypes, c: Banding pattern of plasmids digested with *EcoRI* and *HindIII* enzymes, plasmid with length of 2886bp and inserted fragment with length of 350bp. The size of fragments was determined based on 100bp size marker.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.10.3]

توالی یابی قطعات توسط شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی انجام شد. هم‌ردیفی براساس الگوریتم هم‌ردیفی چندگانه برنامه CromasV1.45l و برآورد میزان چند شکلی، جایگزینی‌های مشابه (Ks)، جایگزینی‌های نامشابه (Ka) و نسبت Ka/Ks با برنامه Dnasp ver3.0 (Rozas and Rozas, 1998) انجام شد. ژنوتیپ‌ها با استفاده از الگوریتم Neighbor-Joining برنامه MEGA4.0 (Kumar *et al.*, 2008) گروه‌بندی شدند.

نتایج و بحث

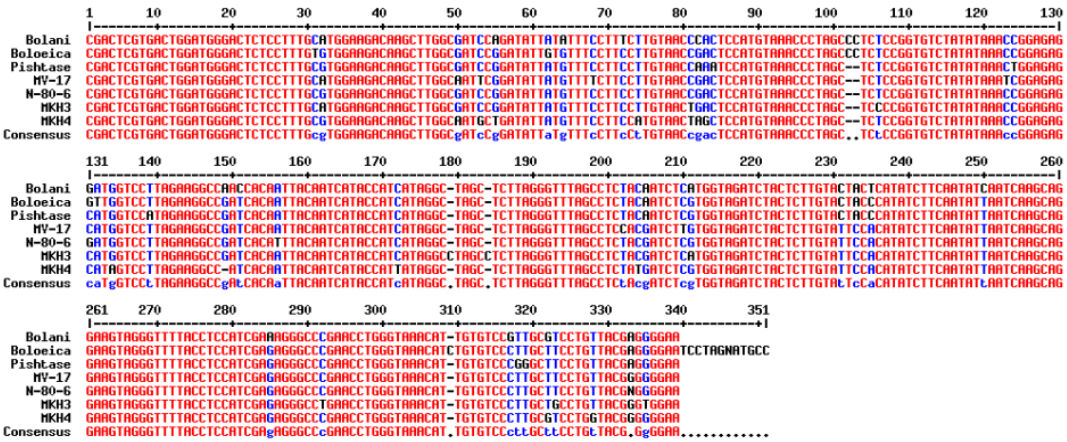
براساس گرادیان دمایی، دمای اتصال بهینه برای سه جفت آغازگر به ترتیب ۵۶، ۵۱ و ۵۲ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. در شکل ۱ (الف) و (ب) و (ج) به ترتیب گرادیان دمایی برای تعیین دمای اتصال بهینه، الگوی تکثیری قطعه ژن *Lr35* و الگوی نواری پلاسمیدهای برش یافته با آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *HindIII* نشان داده شده است. سه جفت آغازگر مورد استفاده الگوی نواری مشابهی را در ژنوتیپ‌ها ایجاد کردند.

هم‌ردیف کردن توالی قطعه ژن Lr35 تکثیر در ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی و بررسی تنوع نوکلئوتیدی

هم‌ردیف کردن توالی‌های تکثیری با استفاده از جفت آغازگر اول در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان دهنده وجود ۲۹۳ جایگاه تک‌شکل و ۵۲ جایگاه چندشکل بود. در ۳۷ جایگاه از جایگاه‌های چندشکل تفاوت تک‌نوکلئوتیدی وجود داشت (شکل۲). میزان تنوع نوکلئوتیدی قطعات تکثیری در ارقام ۰/۳۹۵۲۲برآورد شد.

هر سه توالی حاصل از تکثیر ژن *Lr35* با بخش‌های مختلف توالی‌های یکسانی از NCBI هم‌ردیف شدند که در اینجا فقط بلاست توالی حاصل از یک جفت آغازگر نشان داده شده است. بلاست توالی‌ها نشان داد که قطعات تکثیری از ژن *Lr35*، با توالی ژن *Lr35* گندم نان موجود در NCBI شباهت ۹۵ درصدی داشت.

همچنین توالی حاصل شباهت ۹۳ درصد با ژن *Lr21* از کلون کاسمیدی ۱–۷–۶۹ *Aegilops tauschii*، ۸۷ درصد با ژن گلوتنین A با وزن مولکولی بالا از *Triticum turgidum* و ۸۴ درصد با کلون BAC 1836I21 ژن پلاستیدی‌استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز



شکل ۲- هم ردیفی توالی ۳۵۰ جفت بازی از ژن *Lr35* تکثیر شده با استفاده از جفت آغازگر Lr35–1 در هفت ژنوتیپ گندم نان. جایگاه‌های چندشکل با رنگ متفاوت در مقایسه با جایگاه‌های تک شکل نشان داده شده‌اند.

Fig. 2. Alignment of *Lr35* gene fragment with length of 350 bp amplified in seven wheat genotypes using Lr35-1 primer pair. Polymorphic sites are shown with different color as compared with monomorphic sites.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.10.3]

(*Acc–1*) از *T. turgidum* بود (جدول ۲). ژن *ACC–1* از ژن‌های کاندیدا در تکامل گندم است که در بررسی منشا سه ژنوم گندم نان از *T. urartu*، دهنده ژنوم A، *Ae. tauschii*، دهنده ژنوم D و *T. turgidum*، دهنده ژنوم B به گندم هگزاپلوئید شناسایی شده است (Chalupska *et al*., 2008).

سیفارث و همکاران (Seyfarth *et al*., 1999) با استفاده از دو جفت آغازگر قطعاتی از ژن *Lr35* را تکثیر و آن‌ها را در کروموزوم 2B و در مجاورت نشانگرهای RFLP؛ BCD260، PSR540 و WG996 مکان یابی کردند. آن‌ها یک مضاعف شدگی ۲۹ جفت بازی را در لاین ایزوژن TH*Lr35* مقاوم به زنگ از رقم Thatcher شناسایی و با طراحی جفت آغازگر بر اساس قسمت ۲۹ جفت بازی مضاعف شده، قطعه ۹۳۱ جفت بازی در این رقم را تکثیر نمودند.

توالی تکثیری با استفاده از سه جفت آغازگر، هر کدام دارای یک ORF به ترتیب به‌طول ۱۶۲، ۱۵۶ و ۱۶۰ جفت‌باز بودند و پروتئین‌هایی با طول ۵۴، ۵۲ و ۵۴ اسیدآمینه رمز کردند. بلاست ORFهای شناسایی شده، هم ردیفی آن‌ها را با یک ORF از ژن RPP5 نشان داد. در توالی‌های هم ردیف شده ORFها نواحی غنی از لوسین (LRR) پیش‌بینی شده مشاهده گردید (شکل ۳). نواحی غنی از لوسین بصورت XXLXLXX بودند. در این ترکیب، L لوسین یا هر اسیدآمینه آلیفاتیک دیگر و X، اسیدآمینه های دیگر مخصوصاً آسپارژین و پرولین هستند. بخش XXL ناحیه XXLXKXX، ساختار β–turn و بخش XLXX آن ساختار β- strand تشکیل می‌دهد. بنابراین، یک LRR تشکیل ساختار β–turn-β- strand می‌دهد (Ellis *et al*., 2000) و رشته‌های β تکرارهای مجاور در مکان‌هایی که بنیان-های X در معرض محلول هستند، تشکیل صفحات β موازی می‌دهند که نتیجه آن شناسایی پاتوژن‌ها و یا پروتئین‌های مرتبط با سیستم دفاعی میزبان می‌باشد. این ساختارهای β سپس به ساختارهای α متصل می‌شوند.

تنوع در توالی‌های رمز کننده DNA در این نواحی ناشی از گزینش مثبت می‌باشد (Takken *et al*., 2006). در این ORFها دو ناحیه اتصال دهنده دومین‌ها (Domains) شناسایی شد که یکی از آن‌ها در ناحیه ۴۰ تا ۵۲ در توالی *Lr35*-1، دیگری در ناحیه ۲۲ تا ۴۰ توالی *Lr35*-2 بود. از نظر ساختاری و عملکردی ناحیه اول دارای حساسیت بیشتری بود. نقش ساختار آلفا هلیکس در پروتئین‌ها در ساختارهای پروتئینی متصل شونده به DNA ازقبیل پیچ-خم-پیچ، زیپ‌های لوسینی و واحدهای انگشت روی می‌باشد که این ساختارها در پروتئین‌های مقاومت به میزان زیادی دیده می‌شود (Ellis *et al*., 2000).

گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی براساس توالی‌های تکثیری

براساس توالی این قطعه از ژن *Lr35* ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی به‌غیر از بولوئیکا (بهار) در یک گروه و رقم بولوئیکا به همراه توالی‌های ژن *Pm3* و شبه‌ژن *PRR* از NCBI در گروه دیگر واقع شدند. اغلب توالی‌های NCBI هم ردیف شده با قطعه تکثیری به یک گروه مجزا منتسب شدند. هرچند که این گروه‌بندی، ژنوتیپ‌های مقاوم، نیمه حساس و حساس را به طور کامل تفکیک نکرد، اما ژنوتیپ‌های حساس به زنگ قهوه‌ای در مرحله گیاهچه‌ای مانند MV17، N–80–6 (مغان ۳) و پیشتاز در کنار هم قرار گرفتند و MKH3 ژنوتیپ مقاوم در مرحله گیاهچه‌ای و نیمه مقاوم در مرحله گیاه کامل، از این ژنوتیپ‌ها جدا گردید (شکل۴-الف).

گروه‌بندی ژنوتیپ ها با استفاده از توالی‌های تکثیری از ژن *Lr35* با جفت آغازگر دوم، ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی را به دو گروه منتسب کرد. در این گروه‌بندی ژنوتیپ‌های MV17، N–80–6 (مغان ۳)، MKH4، پیشتاز، بولوئیکا (بهار) و بولانی به همراه توالی مربوط به *Lr35* از NCBI در یک گروه قرار گرفتند و ژنوتیپ MKH3 به همراه سایر توالی‌های NCBI در

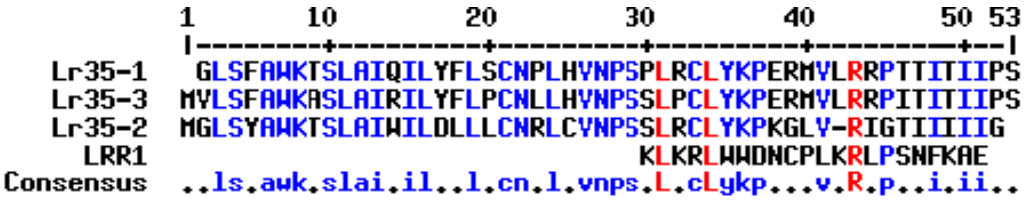
[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.10.3]

جدول۲- بلاست توالی قطعه تکثیر شده با استفاده از جفت آغازگر *Lr35*–1 با توالی‌های موجود در NCBI

Table 2. Blast of *Lr35* gene amplified fragment sequence with NCBI sequences by *Lr35-1* primer pair.

شماره دسترسی Accession No.	مشخصات توالی Sequence characteristics	شباهت Similarity (%)
DQ001172.1	*Triticum aestivum Lr35*–related genomic sequence	93
AF532104.1	*Aegilops tauschii* strain TA1649 cosmid 69–7–1 *Lr21* gene, complete cds; and unknown gene	93
AY494981.1	*Triticum turgidum* A genome HMW glutenin A gene locus, sequence	88
AM932685.1	*Triticum aestivum* 3B chromosome, clone BAC TA3B95F5	84
EU660896.1	*Triticum urartu* clone BAC 059G16 plastid acetyl–CoA carboxylase (*Acc–1*) gene, complete cds; nuclear gene for plastid product	84
AY146587.2	*Triticum turgidum* subsp. durum Pm3 locus, genomic sequence	84
AY951944.1	*Triticum monococcum* TmBAC 21C6 FR–Am2 locus, genomic sequence	84
EU660898.1	*Triticum turgidum* subsp. durum clone BAC 1836I21 hypothetical protein and plastid acetyl–CoA carboxylase (*Acc–1)* genes, complete cds	84
EF081030.1	*Triticum urartu* clone BAC 404H6 genomic sequence	88
AY485644.1	*Triticum monococcum* phosphatidylserine decarboxylase, ZCCT2, ZCCT1, and SNF2P genes, complete cds; nucellin pseudogene, complete sequence; putative transposase, phosphatidylinositol phosphatidylcholine transfer protein sec14 cytosolic–like protein, and phytochrome P450–like protein genes, complete cds; and unknown genes	84
AF326781.1	*Triticum monococcum* actin (*ACT–1*) gene, partial cds; putative chromosome condensation factor (CCF), putative resistance protein (RGA–2), putative resistance protein (RGA2) and putative nodulin–like–like protein (NLL) gene, complete cds; and retrotransposons Josephine, Angela–2, Angela–4, Heidi, Greti, Angela–3, Fatima, Erika–1, Angela–6, Angela–5, Barbara, Isabelle, Erika–2, and Claudia	82
EU660900.1	*Triticum aestivum* clone BAC 611K20 plastid acetyl–CoA carboxylase (*Acc–1*) gene, complete cds; nuclear gene for plastid product	83
FJ345685.1	*Triticum aestivum* MITE Eos–6 and retrotransposon Gypsy solo–LTR, complete sequence	84
DQ885753.1	*Triticum aestivum* cultivar Chinese Spring chromosome 2A pseudo–response regulator (*PRR*) gene, complete cds	81



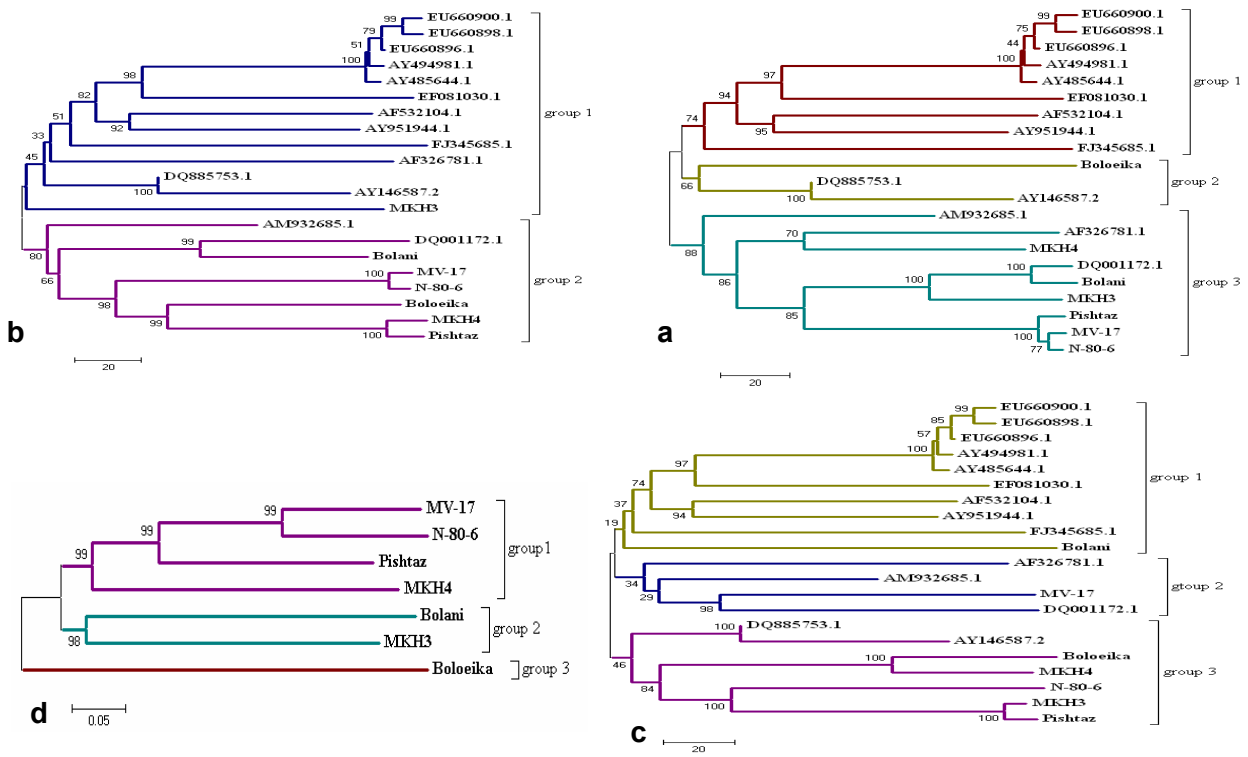
شکل ۳- هم‌ردیفی توالی‌های اسیدآمینه‌ای رمز شده توسط چارچوب‌های قرائت آزاد شناسایی شده در قطعات تکثیری از ژن *Lr35* توسط جفت آغازگرهای Lr35-1، Lr35-2 و Lr35-3

Fig. 3. Alignment of amino acid sequences coded by ORF identified in *Lr35* gene fragments amplified using Lr35-1, Lr35-2 and Lr35-3 primer pairs

گروه دیگر واقع شدند، بنابراین گروه‌بندی براساس این توالی توانست MKH3 را بعنوان یک ژنوتیپ مقاوم از بقیه جدا کند. در گروه اول نیز بولانی بعنوان رقم حساس در مراحل گیاهچه‌ای و گیاه کامل از سایر ژنوتیپ‌ها تفکیک گردید (شکل ۴-ب). تنوع نوکلئوتیدی برای توالی مربوطه در ژنوتیپ‌های مورد

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.10.3]



شکل ۴- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های گندم نان مورد ارزیابی براساس توالی قطعات تکثیری از ژن *Lr35* با استفاده از جفت آغازگر a: Lr35-1، b: Lr35-2، c: Lr35-3 و d: کلیه توالی‌ها

Fig. 4. Grouping of the studied wheat genotypes based on *Lr35* gene sequences amplified using a: Lr35-1 primer pair, b: Lr35-2 primer pair, c: Lr35-3 primer pair and d: all the sequences

مطالعه ۰/۵۵۶۸۰ برآورد شد.

براساس توالی‌های تکثیر شده با استفاده از جفت آغازگر Lr35-3، ارقام بولانی (حساس) و MV-17 (مقاوم در مرحله گیاه کامل) در گروه‌های جداگانه و بقیه ژنوتیپ‌ها در یک گروه قرار گرفتند. در این تجزیه، رقم MV-17 به همراه توالی ژن *Lr35* از NCBI در یک گروه و رقم بولانی با سایر توالی‌های NCBI در گروه دیگر واقع شدند (شکل۴-ج). تنوع نوکلئوتیدی بین ژنوتیپ‌ها برای این توالی ۰/۶۴۷۵۰ برآورد شد.

در نهایت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از توالی‌های تکثیری حاصل از سه جفت آغازگر ژنوتیپ‌های MV-17، N-80-6 (مغان ۳)، پیشتاز و MKH4 را در گروه یک قرار داد و رقم بولانی (حساس) و MKH3 (مقاوم) در گروه دوم و رقم بولوئیکا (بهار) در گروه سوم واقع شدند (شکل ۴-د).

بنابراین، گروه‌بندی حاصل با پاسخ به زنگ قهوه‌ای ارقام مطابقت نداشت. مقایسه گروه‌بندی‌های حاصل نشان داد که تجزیه خوشه‌ای براساس توالی قطعه ژن *Lr35* تکثیر شده با استفاده از جفت آغازگر دوم با پاسخ ژنوتیپ به زنگ مطابقت داشت و احتمالاً تغییرات نوکلئوتیدی در این ناحیه از ژن باعث تفاوت ژنوتیپ‌ها در القای مقاومت شده است.

میزان جایگزینی‌های مشابه و نامشابه در ژن *Lr35*

در جدول ۳ میزان جایگزینی‌های مشابه و نامشابه برآورد شده برای توالی‌های ژن *Lr35* را در ژنوتیپ‌های گندم نان ارائه شده است. در قطعات تکثیری از ژن *Lr35* با استفاده از سه جفت آغازگر Lr35-1، Lr35-2 و Lr35-3 نسبت Ka/Ks بیشتر از یک (Ka/Ks >1) بود، این نشان می‌دهد که احتمالاً گزینش مثبت (Positive selection) یا گزینش در جهت ایجاد تنوع

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.10.3]

(Diversifying selection) برای جایگزینی یک اسیدآمینه عمل کرده است. این حالت گاهی اوقات در پروتئین‌های آنتی‌ژنی رمزشده بوسیله عوامل بیماری‌زا مشاهده می‌شود که تحت فشار گزینشی قوی در جهت

جدول ۳- میزان جایگزینی‌های مشابه و نامشابه در ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای *Lr35*

Table 3. Synonymous and non synonymous substitutions in Leaf rust *Lr35* gene

	گزینش خالص کننده Purifying selection	گزینش در جهت ایجاد تنوع Diversifying selection				
Primer آغازگر	Ks>Ka	Ka>Ks	Ka/Ks[b]	Ka	Ks	π[a]
Lr35-1	+	–	1.1321	0.9670	1.6253	0.15072
Lr35-2	+	–	0.8151	1.4292	1.7654	0.55680
Lr35-3	+	–	0.8255	0.54399	1.52	0.64750

a: The average nucleotide diversity of all pairwise comparisons — a: میانگین تنوع نوکلئوتیدی در کلیه جفت مقایسات

b: The average of Ka/Ks of all pairwise comparisons — b: میانگین Ka/Ks در کلیه جفت مقایسات

ایجاد تغییر به منظور اجتناب از واکنش‌های ایمنی در میزبان است. این نوع گزینش برای تثبیت جایگزینی‌های مطلوب استفاده می‌شود.

بطورکلی نتایج این آزمایش نشان دهنده وجود تنوع نوکلئوتیدی بین ژنوتیپ‌های مقاوم، نیمه مقاوم و حساس در بخش‌هایی از ژن *Lr35* بود. وجود چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) بین ژنوتیپ‌ها در این نواحی می‌تواند برای طراحی آغازگرهای اختصاصی بر اساس SNPها جهت شناسایی ژنوتیپ‌ها استفاده شود.

سپاسگزاری

این تحقیق در آزمایشگاه ژنومیک و اصلاح نباتات مولکولی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز و با حمایت مالی قطب علمی اصلاح مولکولی غلات دانشگاه تبریز انجام شد. از آقای دکتر منوچهر خدارحمی، عضو هیات علمی بخش غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر برای فراهم کردن بذر ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

References

Birnboim, H. C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513–1523.

Chalupska D., H. Y. Lee, J. D. Faris, A. Evrard, B. Chalhoub, R. Haselkorn and P. Gornicki. 2008. Acc homoeoloci and the evolution of wheat genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. 105: 9691–9696.

CIMMYT. 2005. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. (3th Ed.) CIMMYT, Mexico.

Cloutier S., B. D. McCallum, C. Loutre, T. W. Banks, T. Wicker, C. Feuillet, B. Keller and M. C. Jordan 2007. Leaf rust resistance gene Lr1, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large psr567 gene family. Plant Mol. Biol. 65: 93–106.

Cohen, S. N., A. C. Y. Chang and L. Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Ecsherichia coli* by R–factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 69: 2110–2114.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.10.3]

Drijepondt, S. C. and Z. A. Pretorius. 1989. Greenhouse evolution of adult–plant resistance conferred by the gene *Lr34* to leaf rust of wheat. Plant Dis. 73: 669–671.

Ellis J., P. Dodds and T. Pryor 2000. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. Curr. Opin. Plant Biol. 3: 278–284.

Ellis J. G., G. J. Lawrence, J. E. Luck and P. N. Dodds. 1999. Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene *L* that determine differences in gene for gene specificity. Plant Cell 11: 495-506.

Feuillet, C., S. Travella, N. Stein, L. Albar, A. Nublat and B. Keller. 2003. Map based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 15253–15258.

German, S. E. and J. A. Kolmer. 1992. Effect of *Lr34* in the enhancement of resistance of leaf rust of wheat. Theor. Appl. Genet. 84: 97–105.

Gold, J., D. Harder, F. Townley–Smith, T. Aung and J. Procunier. 1999. Development of molecular marker for rust resistance genes *Sr39* and *Lr35* in wheat breeding lines. J. Biotech. 2: 35–40.

Huang L., S. A. Brooks, W. Li, J. P. Fellers, H. N. Trick and B. S. Gill. 2003. Map based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploid genome of bread wheat. Genetics 164: 655–664.

Jiang H., C. Wang, L. Ping, D. Tian and S. Yang. 2007. Pattern of LRR nucleotide variation in plant resistance genes. Plant Sci. 173: 253–261.

Kerber, E. R. and P. L. Dyck. 1990. Transfer to hexaploid wheat of linked genes for adult-plant leaf rust and seedling stem rust resistance from an amphiploid of *Aegilops speltoides* x *Triticum monococcum*. Genome 33: 530–537.

Knott, D. R. 1989. The Wheat Rusts: Breeding for Resistance. Monographs on Theor. Appl. Genet. Springer, Berline.

Kolmer, J. A. 1997. Virulence in *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* isolates from Canada to genes for adult–plant resistance to wheat leaf rust. Plant Dis. 81: 267–271.

Kumar, S., J. Dudley, M. Nei and K. Tamura. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Brief. Bioinform. 9: 299-306.

McIntosh, R. A., C. R. Welling and R. F. Park. 1995. Wheat Rusts: On Atlas of Resistance Genes. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

Rozas, J. and R. Rozas. 1998. Dnasp version 3: An integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. Bioinformatics Application Note 15: 174-175.

Saghai-Maroof, M. A., K. Soliman, R. A. Jorgensen and R. W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 8014–8018.

Seyfarth, R., C. Feuillet, G. Schachermayer, M. Winzeler and B. Keller. 1999. Development of a molecular

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.10.3]

marker for the adult plant leaf rust resistance gene *Lr35* in wheat. Theor. Appl. Genet. 99: 554–560.

Singh, R. P. 1992. Association between gene *Lr34* for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in wheat. Crop Sci. 32: 874–878.

Takken F. L. W., M. Albrecht and W. I. L. Tameling. 2006. Resistance proteins: Molecular switches of plant defence. Curr. Opin. Plant Biol. 9: 383-390.

Xing L. I., W. Yang, Y. Li, D. Liu, H. Yan, Q. Meng and T. Zha. 2007. Identification of AFLP markers linked to *Lr19* resistance to wheat leaf rust. Agric. Sci. China 6: 311-315

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.10.3]

Structural variation of leaf rust resistance gene *Lr35* in resistant and susceptible bread wheat (*Triticum aestivum* L.)genotypes

Rahimeh Hemati[1], Seidabolghasem Mohammadi[2] and Saeed Aharizad[3]

ABSTRACT

R. Hemati., S. A. G. Mohammadi, and S. Aharizad. 2010. Structural variation of leaf rust resistance gene Lr35 in resistant and susceptible bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes**. Iranian Journal of Crop Sciences. 12 (4) 499-509 (In Persian)**

Leaf rust is one of the most important diseases of wheat causing grain yield loss in most of the wheat growing areas in the world. Development of resistant cultivars is one of the main approaches to control rust diseases. Understanding the genetic basis of resistance and indentifying resistance genes are essential for developement of resistant cultivars. In this study, three specific primer pairs designed based on NCBI data were used and fragments from *Lr35* gene with lengths of 340 to 351 base pairs were amplified. The fragments were then cloned and sequenced. The alignment of *Lr35* gene sequence revealed 93% similarity with *Lr35* sequence from NCBI. In addition, the sequences showed 93% similarity to *Lr21* gene from cosmid No. 69-7-1 clone of *Aegilops tauschii*, 87% to high molecular weight glutenin A gene from *Triticum turgidum,* 84% to plastid gene acetyl-CoA carboxylase from *T. turgidum* as well as bread wheat powdery mildew and cold tolerance genes. The fragments amplified using three primer pairs consisted of one open reading frame with lengths of 162, 156 and 160 base pairs coding proteins with lengths of 54, 52 and 54 amino acids, respectively. Structure analysis of sequences revealed the presence of leucine rich repeats which is a conserved site in plant disease resistance genes. Cluster analysis based on sequences of *Lr35* gene amplified using the second primer pair could group genotypes according to their response to leaf rust. Ratios of nonsynonymous (*Ka*) to synonymous (*Ks*) nucleotide substitutions indicated the possible role of positive or diversifying selection in nucleotide diversity of this gene. Nucleotide diversity among resistant, moderately resistant and susceptible genotypes could be used to design primers based on SNPs Markers for identification of resistant and susceptible cultivars.

Key words: Nucleotide diversity, Plant disease resistance genes, Synonymous substitution and Wheat

Received: November, 2009 Accepted: February, 2010

1- Former MSc Student in Biotechnology, The University of Tabriz, Iran
2- Prof., The University of Tabriz, Iran (Corresponding author) (Email: mohammadi@tabriz.ac.ir)
3- Associate Prof., The University of Tabriz, Iran

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.10.3]