

## تنوع نوکلئوتیدی نواحی ژنومی ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای *Lr29* و *Lr47* در لاین‌های گندم نان (*Triticum aestivum* L.)

سید ابوالقاسم محمدی<sup>۱\*</sup>، رحیمه همتی‌گوگه<sup>۲</sup> و سعید اهری‌زاد<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> استاد گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

<sup>۲</sup> دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

<sup>۳</sup> دانشیار گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

\*مسئول مکاتبه: [mohammadi@tabrizu.ac.ir](mailto:mohammadi@tabrizu.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۲۷

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۲/۱۴

### چکیده

زنگ قهوه‌ای یکی از بیماری‌های مهم گندم است که خسارت زیادی به محصول آن وارد می‌کند. تولید ارقام مقاوم، روشی موثر، زیست محیطی و کم هزینه برای کاهش خسارت آن است. هدف این مطالعه، جداسازی و توالی‌یابی ژن‌های *Lr29* و *Lr47* انتقال یافته به گندم بترتیب از *Agropyron elongatum* و *Triticum speltoides* در هفت لاین گندم نان با درجات متفاوت مقاومت به زنگ قهوه‌ای بود. با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی برای ژن *Lr47* قطعه‌ای با طول ۳۹۶ جفت‌باز با پنج چارچوب قرائت آزاد (ORF) در لاین‌های مورد مطالعه تکثیر و توالی‌یابی شد. دامنه ایجاد شده توسط این قطعه با ۳۷ اسیدآمین با پروتئین آگلوتینین جوانه گندم که یک پروتئین ضد میکروبی است ۳۶ درصد همولوژی نشان داد. هم‌ردیف کردن این توالی با اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی NCBI بیانگر شباهت ۹۹ درصدی آن با ژن ساکارز سنتتاز نوع یک گندم نان بود. تنوع نوکلئوتیدی ژن *Lr47* در لاین‌های مورد مطالعه برابر با ۰/۰۰۴۱ برآورد شد. همچنین رقم حساس بولانی دارای یک فقدان بزرگ به اندازه ۴۸ نوکلئوتید در انتهای<sup>۱</sup> غیر رمزکننده بود که آن را از بقیه لاین‌ها متمایز می‌کرد. طول قطعه تکثیری ژن *Lr29* برابر با ۱۶۰ جفت‌باز بود که به ترتیب شباهت ۹۱ و ۹۰ درصدی با ژن استیل کوآنزیم A کربوکسیلاز گندم نان و *Aegilop stauschii* نشان داد. در توالی این ژن ۲۸ جایگزینی تک نوکلئوتیدی با تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۵۸۹ وجود داشت. نسبت جایگزینی‌های همنام و غیرهمنام در ژن‌های *Lr47* و *Lr29* به ترتیب نشان دهنده گزینش منفی و مثبت برای این ژن‌ها در لاین‌های مورد ارزیابی بود.

واژه‌های کلیدی: جایگزینی همنام و غیر همنام، چارچوب قرائت آزاد، زنگ قهوه‌ای، گندم نان.

کالری دریافتی هر فرد را تشکیل می‌دهد. در سال زراعی ۸۹-۱۳۸۸ سطح زیر کشت گندم ۶/۹۵۱ میلیون هکتار با میزان کل تولید ۱۳/۴ میلیون تن بود (وهاب زاده و محفوظی ۲۰۱۱). آمارها نشان می‌دهد که جمعیت جهان تا سال ۲۰۲۵ میلادی به ۷/۹ میلیارد نفر خواهد رسید که در بهترین شرایط به سالانه ۸۰۰ میلیون تن گندم نیاز خواهد داشت (فائو ۲۰۰۹). تامین این مقدار، اهمیت رشد سریع و مداوم تولید گندم را

### مقدمه

گندم *Triticum aestivum* یکی از مهمترین گیاهان زراعی می‌باشد که حدود ۲۰٪ (۲۲۰ میلیون هکتار) از کل اراضی دنیا به آن اختصاص یافته و ماده غذایی اصلی حدود ۳۵٪ مردم جهان را تشکیل می‌دهد. در ایران نیز گندم منبع اصلی کالری و پروتئین مورد نیاز جمعیت کشور است. بطوریکه ۷۵٪ پروتئین و ۶۵٪

بیش از نیمی از این ژن‌ها از خویشاوندان وحشی گندم وارد ژرم‌پلاسما آن شده‌اند که تعدادی از آن‌ها علاوه بر ایجاد مقاومت، بر خصوصیات زراعی ارقام نیز تاثیر دارند (فیولت و همکاران ۲۰۰۳، برویس و همکاران ۲۰۰۸).

مطالعات متعددی در راستای ارزیابی کارایی این ژن‌ها در القای مقاومت به زنگ قهوه‌ای انجام شده است. الیاسی-گماری (۲۰۱۰) با بررسی قدرت بیماری-زایی ایزوله‌های مختلف قارچ *P. tritricina* روی ۳۵ لاین ایزوژن گندم دارای ژن‌های *Lr* مختلف تحت شرایط مزرعه‌ای گزارش کرد که لاین‌های ایزوژن حامل ژن‌های *Lr9*، *Lr25*، *Lr28* و *Lr29* کاملاً مقاوم به کلیه جدایه‌های مورد ارزیابی بودند و خسارت زنگ قهوه‌ای در آن‌ها مشاهده نشد. لابوسچاجنی و همکاران (۲۰۰۴) نیز گزارش کردند که در افریقای جنوبی، ژنوتیپ‌های گندم دارای ژن‌های *Lr29*، *Lr34* و *Lr37* مقاوم به جدایه‌های مختلف قارچ عامل زنگ قهوه‌ای هستند. آن‌ها با ارزیابی مجموعه‌ای از لاین BC6 حامل این ژن‌ها مشاهده نمودند که وجود ژن‌های *Lr29*، *Lr34* و *Lr37* علاوه بر القای مقاومت به زنگ قهوه‌ای باعث افزایش پروتئین آرد و قدرت جذب آب آن نیز می‌شود. ژن *Lr29* از *Agropyron elongatum* به کروموزوم 7D گندم منتقل شده است. ژن *Lr47* نیز مقاومت به طیف وسیعی از نژادهای زنگ قهوه‌ای را در مرحله گیاه بالغ موجب می‌شود. این ژن که روی بازوی کوتاه کروموزوم *T. speltoides 7S* قرار دارد، در اثر جابجایی یک قطعه کوتاه کروموزومی به بازوی کوتاه کروموزوم 7A گندم نان منتقل شده است (هلوگوترا و همکاران ۲۰۰۰، وان زتی و همکاران ۲۰۰۶). موثر بودن ژن *Lr47* در مقابل نژادهای مختلف بیماری‌زای پاتوژن عامل زنگ قهوه‌ای توسط دابکوسکی و همکاران (۱۹۹۸) گزارش و استفاده از آن در برنامه‌های اصلاح برای مقاومت پیشنهاد شده است. انتقال قطعات کروموزومی حامل ژن *Lr47* به

آشکار می‌سازد که تولید ارقام پرمحصول مقاوم به بیماری و تنش‌های محیطی با استفاده از روش‌های اصلاح کلاسیک و مدرن (بیوتکنولوژیکی) از راهکارهای اصلی رسیدن به این هدف می‌باشد (رجاران ۲۰۰۵ و ویلیام و همکاران ۲۰۰۵). بیماری‌ها از جمله تنش‌های زیستی اصلی و کاهش‌دهنده کمیت و کیفیت گندم می‌باشند. در بین بیماری‌های گندم، زنگ‌ها خسارت زیادی به محصول وارد می‌کنند. در ایران، زنگ قهوه‌ای بیشترین خسارت را بعد از زنگ زرد به همراه دارد. زنگ قهوه‌ای که بوسیله پاتوژن قارچی *Puccinia tritricina* ایجاد می‌شود، از نظر اقتصادی و تاریخی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های گندم در دنیا است و کاهش عملکرد گندم در نتیجه ظهور این بیماری در اغلب سال‌ها در مناطق زیر کشت گندم مشاهده می‌شود (ماراساس و همکاران ۲۰۰۴). تولید ارقام مقاوم یکی از راهکارهای اصلی مقابله با زنگ قهوه‌ای در گندم می‌باشد. وارد کردن ژن‌های مقاومت به بیماری از منابع مختلف به ارقام تجاری گندم هنوز از مهمترین اهداف برنامه‌های به‌نژادی این گیاه در سراسر جهان است. استفاده از ارقام مقاوم و ژن‌های مقاومت به بیماری، علاوه بر کاهش هزینه‌های تولید از طریق به حداقل رساندن مصرف قارچ‌کش‌ها، از خطرات زیست محیطی نیز جلوگیری می‌کند (وان زتی و همکاران ۲۰۰۶، کیو و همکاران ۲۰۰۷). ماراساس و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند، سالانه ۵/۳۶ میلیون دلار خسارت کاهش محصول گندم در نتیجه بروز زنگ قهوه‌ای بدون استفاده از ارقام مقاوم خواهد بود. با کشف اساس ژنتیکی مقاومت به بیماری‌های گیاهی و تئوری ژن برای ژن، از مقاومت اختصاصی به نژادهای خاص پاتوژن در برنامه‌های به‌نژادی گندم استفاده گردید. در این راستا تا به حال بیش از ۶۶ ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای شناسایی و تعداد زیادی از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (کولمر ۱۹۹۶، مک اینتاش و همکاران ۲۰۰۹).

را با توالی این ژن در NCBI و شباهت ۹۳ درصدی با ژن *Lr21* از کلون کاسمیدی -Aegilopstauschii69- 7-1 را گزارش کردند. بررسی ساختاری 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* ژنوتیپ‌ها را براساس پاسخ به زنگ آن‌ها گروه بندی کرد. نسبت جایگزینی‌های نامشابه به مشابه نشان دهنده نقش احتمالی گزینش مثبت و یا گزینش ایجاد کننده تنوع در تغییرات نوکلئوتیدی این ژن بود. هدف این مطالعه جداسازی، همسانه‌سازی، توالی‌یابی و بررسی تفاوت‌های ساختاری دو ژن *Lr47* و *Lr29* در لاین‌های مقاوم و حساس گندم نان به زنگ قهوه‌ای جهت استفاده در برنامه‌های آتی اصلاح به کمک نشانگر است.

### مواد و روش‌ها

مواد گیاهی شامل هفت لاین گندم نان با درجات مقاومت متفاوت در دو مرحله گیاهچه و گیاه کامل می‌باشند (جدول ۱).

استخراج DNA ژنومی به روش سقای معروف و همکاران (۱۹۸۴) انجام و کمیت و کیفیت نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر و الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد. قطعاتی از ژن‌های *Lr47* و *Lr29* به ترتیب با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (pCapsF/ pCaps (Ps10L2) (هلوگنرا و همکاران ۲۰۰۰) و SCAR (Lr29-18F/Lr29-18R) (تار و همکاران ۲۰۰۲) تکثیر شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۱۰۱μ و با استفاده از پروتکل سمیت (۲۰۰۵) انجام گردید (جدول ۲ و ۳). قطعات تکثیری از ژل جداسازی و به ناقل pTZ57RT الحاق و در باکتری *E. coli* سویه DH5α همسانه و کلنی‌های سفید رنگ حاوی قطعات تکثیری برای استخراج پلاسمید انتخاب شدند.

گندم علاوه بر القای مقاومت به زنگ قهوه‌ای، خصوصیات زراعی آن را نیز تحت شرایط عاری از بیماری تحت تاثیر قرار می‌دهد. اثر منفی این ژن بر ویژگی‌های نانویی گندم نیز گزارش شده است که به احتمال زیاد ناشی از پیوستگی ژنی یا اثر پلیوتروپی می‌باشد. بنابراین، شناسایی نشانگرهای پیوسته یا اختصاصی برای این ژن می‌تواند اثرهای نامطوب پیوستگی ژنی را در برنامه‌های اصلاحی بر طرف کند. برای تعدادی از ژن‌های *Lr* نشانگرهای مولکولی پیوسته شناسایی و جایگاه ژنومی آن‌ها مشخص شده است (هلوگنرا و همکاران ۲۰۰۰، تار و همکاران ۲۰۰۲، وان زتی و همکاران ۲۰۰۶، گال و همکاران ۲۰۰۷، سینگ و همکاران ۲۰۱۱). تار و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از جمعیت F<sub>2</sub> حاصل از تلاقی رقم تاچر و لاین ایزوژن دارای ژن *Lr29* یک نشانگر RAPD پیوسته با این ژن را شناسایی و به یک نشانگر SCAR تبدیل کردند. بلاسزکزیک و همکاران (۲۰۰۴) برای ژن *Lr29* یک نشانگر STS طراحی کردند که در ارقام مقاوم و حساس به ترتیب قطعاتی به طول ۹۰۰ و ۸۵۰ جفت باز تکثیر می‌کرد. وان زتی و همکاران (۲۰۰۶) با ارزیابی لاین‌های ایزوژن واجد و فاقد ژن *Lr47* از ۱۰ رقم یا لاین اصلاحی، این ژن را در بازوی کوتاه کروموزوم 7A پیوسته با نشانگر ریزماهواره Xgwm60 مکان-یابی کردند. اگرچه، شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های مقاومت کارآیی استفاده از این ژن‌ها را در برنامه‌های اصلاحی افزایش داده است ولی در سال‌های اخیر جداسازی، همسانه سازی و توالی‌یابی تعدادی از ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای مانند ژن‌های *Lr10*، *Lr21* و *Lr1* از گندم هگزاپلوئید، تولید نشانگرهای اختصاصی مبتنی بر تفاوت‌های ساختاری ژن‌ها در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس را امکان‌پذیر کرده است (کلوتیر و همکاران ۲۰۰۷). همتی و همکاران (۱۳۸۹) با تعیین توالی ژن *Lr35* در لاین‌های حساس و مقاوم گندم به زنگ قهوه‌ای، شباهت ۹۵ درصدی آن

جدول ۱- لاین‌های گندم نان مورد مطالعه و درجات مقاومت آن‌ها به زنگ قهوه‌ای.

لاین	مرحله گیاهچه	مرحله گیاه کامل
<b>Bolani</b> (بولانی)	حساس	حساس
<b>MV17</b>	نیمه مقاوم/ مقاوم	نیمه مقاوم/ نیمه حساس
<b>Pishtaz</b> (پیشتاز)	نیمه حساس/ حساس	حساس
<b>MKH3</b>	نیمه مقاوم/ نیمه حساس	مقاوم
<b>MKH4</b>	نیمه مقاوم/ نیمه حساس	حساس
<b>(Moghan3) (مغان ۳) N-80-6</b>	نیمه حساس/ حساس	حساس
<b>Bahar</b> (بهار <b>Boloeika</b> بولونیکا)	نیمه مقاوم/ نیمه حساس	حساس

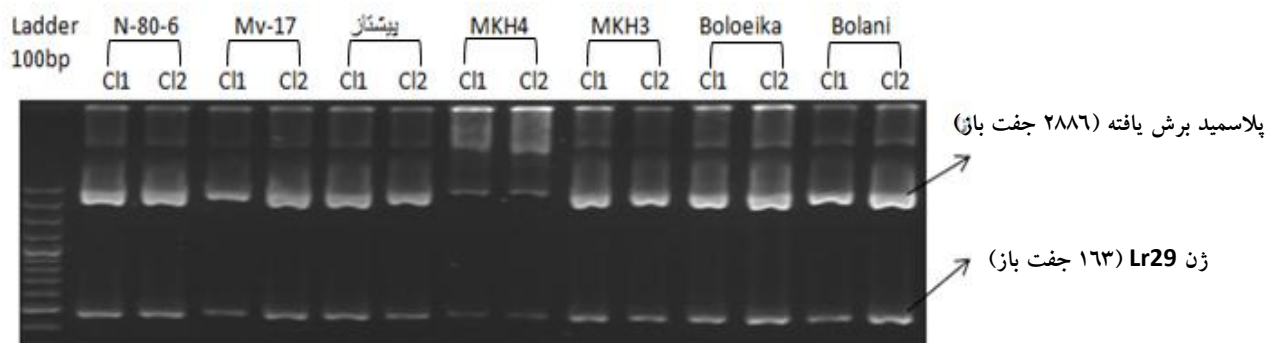
منفی برای جایگزینی یک اسید آمینه در یک ناحیه از ژن می‌باشد (هیوس و نی ۱۹۸۸).

### نتایج و بحث

#### ژن *Lr47*

با استفاده از جفت آغازگر pCapsF/Ps10L2، قطعه‌هایی به طول ۳۹۶ جفت باز از ژن *Lr47* در هفت لاین گندم مورد مطالعه تکثیر شد. پس از همسانه سازی قطعه مورد نظر، برای اطمینان از درج مناسب آن، پلاسمیدها با استفاده از آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *HindIII* برش داده شدند. وجود قطعه پلاسمید با اندازه ۲۸۸۶ جفت باز نشان دهنده صحت درج قطعه مورد نظر و نیز صحت برش بود (شکل ۱). هم‌ردیف کردن توالی ژن در لاین‌ها، نشان دهنده وجود پنج چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) با تنوع نوکلئوتیدی برابر با ۰/۰۰۴۱ بود. لاین MKH4 دارای سه SNP در

استخراج پلاسمید به روش برین‌بوئیم ودالی (۱۹۷۹) انجام و قطعات حاصل از برش پلاسمیدها پس از تیمار آنزیمی با آنزیم‌های *EcoRI* و *HindIII* که در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد، برای توالی-یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. توالی‌های حاصل با استفاده از برنامه ChromasLite 2.01 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. هم‌ردیف کردن توالی‌ها با استفاده از برنامه-های ClustalX, Wver 1.81 صورت گرفت. وجود چندشکلی‌ها با استفاده از برنامه Dnasp ver4.0 (رزاز و رزاز ۱۹۹۸) انجام شد. از برنامه Dnasp برای برآورد نسبت Ka/Ks استفاده شد که نسبت جایگزینی‌های غیر همنام به جایگزینی‌های همنام نمایانگر وجود فشار گزینشی روی یک ناحیه می‌باشد. نسبت Ka/Ks کوچکتر از یک، نشان دهنده گزینش



شکل ۱- الگوی نواری پلاسمیدهای برش یافته با آنزیم‌های *EcoRI* و *HindIII* پلاسمید pTZ57RT با طول ۲۸۸۶ جفت باز و قطعه

درجی ژن *Lr47* با طول ۳۹۶ جفت باز (cl خلاصه colony می‌باشد).

جدول ۲- اجزای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز.

مقادیر برحسب $\mu$	اجزای واکنش
Amounts as $\mu$ l	Reaction contents
۴	Master Mix
۳.۲	آب دیونیزه
۰.۴	آغازگر مستقیم
۰.۴	آغازگر معکوس
۲.۰	DNA ژنومی
۱۰	حجم کل واکنش

حاضر استفاده شده است) طراحی شده براساس- همسانه شماره ABC465 جو که اورتولوگ با ژن ساکارز سنتتاز نوع یک گندم است، قطعه‌ای به طول ۴۹۰ جفت باز در لاین گندم -T7AS-7S#1S 7S با ترانسلوکاسیون کروموزوم 7A با 7AL ساکارز سنتتاز نوع یک بخصوص در درصدی با ژن ساکارز سنتتاز نوع یک بخصوص در انتهای ۳' غیر رمز کننده نشان داد. مقایسه همسانه‌های مختلف از ژن *Lr47* نشان دهنده وجود یک فقدان بزرگ در انتهای ۳' غیر رمز کننده و حذف شدگی های متعدد در ناحیه اینترون بود که بنظر می‌رسد مشابه فقدان قطعه این ژن در رقم بولانی باشد.

با توجه به همولوژی بالای ژن *Lr47* با ژن ساکارز سنتتاز انتظار می‌رود. این ژن علاوه بر القای مقاومت به زنگ قهوه‌ای، صفات زراعی و کیفیت نانوائی گندم نان را در شرایط عاری از آلودگی تحت تاثیر قرار دهد. برویس و همکاران (۲۰۰۸) با بررسی اثر ژن *Lr47* روی صفات زراعی و کیفیت نانوائی گندم نان طی سه سال با استفاده از لاین‌های ایزوژن پنج رقم گندم واجد و فاقد این ژن گزارش کردند که لاین‌های دارای ژن *Lr47* کاهش ۳/۸ درصدی عملکرد دانه و افزایش ۳/۵ درصدی پروتئین دانه و آرد را

جایگاه‌های اول، دوم و چهارم بود که در جایگاه‌های اول و سوم گوانین جایگزین آدنین و در جایگاه چهارم تیمین جایگزین سیتوزین شده بود. چند شکلی تک نوکلئوتیدی<sup>۱</sup> در جایگاه سوم مربوط به لاین MKH3 بود که در این جایگاه، جایگزینی سیتوزین با تیمین مشاهده شد. در جایگاه پنجم، SNP مربوط به رقم بولونیکا (بهار) با جهش تیمین به سیتوزین بود. رقم حساس بولانی دارای یک حذف شدگی بزرگ به اندازه ۴۸ نوکلئوتید در انتهای ۳' غیر رمز کننده بود که آن را از سایر لاین‌ها متمایز می‌کرد (شکل ۲). بولانی یک رقم حساس به زنگ زرد در مرحله گیاهچه و گیاه کامل است، شاید این فقدان در ژن *Lr47* یکی از عوامل حساسیت بولانی به زنگ قهوه‌ای باشد. هم‌ردیف کردن این توالی با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI نشان دهنده شباهت ۹۹ درصدی آن با توالی ژن ساکارز سنتتاز نوع ۱ (SS1) از گندم نان (با شماره دسترسی AJ249623.1) بود (جدول ۴) و تنها در یک نوکلئوتید با آن تفاوت داشت، بنابراین، توالی حاصل را می‌توان به عنوان یک توالی جدید به بانک اطلاعاتی معرفی کرد.

هلگوئرا و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از جفت آغازگر PS10R و PS10L2 در مطالعه

<sup>۱</sup>Single nucleotide polymorphism

<sup>۲</sup>National Center for Biotechnological Information

پلیوتریپیک ژنی باشد. با توجه به اینکه لاین‌های مورد استفاده ایزوژن بودند، تئوری پلیوتروپیک بیشتر محتمل بنظر می‌رسد.

نشان دادند ولی عملکرد پروتئین آن‌ها در واحد سطح برابر و یا حتی کمتر از والد اصلی آن‌ها بود. این اثر ژن *Lr47* روی ویژگی‌های زراعی و کیفیت نانوائی گندم نان می‌تواند ناشی از پیوستگی ژنی و یا اثر

جدول ۳- چرخه حرارتی و دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز.

چرخه‌ها	دما (درجه سانتیگراد)	زمان (دقیقه)
یک چرخه واسرشته سازی اولیه	۹۵	۵
۳۵ چرخه:		
واسرشته سازی	۹۵	۱
دمای اتصال آغازگر ژن <i>Lr29</i>	۶۲	۱
دمای اتصال آغازگر ژن <i>Lr47</i>	۵۸	۱
بسط آغازگرها	۷۲	۲
یک چرخه بسط نهایی	۷۲	۷

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
Bolani	GGG CAGGCGTTTATCCAGACAACAAATGCGGCTGGCATGACCCAGCGAGCACTGCCAGGACCTCACAAATGTGCCGAGACAACAAATTAACACATCCACGACCCAGCAAAATGAAATACGGCAGA													
Boloelica	GGG CAGGCGTTTATCCAGACAACAAATGCGGCTGGCATGACCCAGCGAGCACTGCCAGGACCTCACAAATGTGCCGAGACAACAAATTAACACATCCACGACCCAGCAAAATGAAATACGGCAGA													
Pishtaze	GGG CAGGCGTTTATCCAGACAACAAATGCGGCTGGCATGACCCAGCGAGCACTGCCAGGACCTCACAAATGTGCCGAGACAACAAATTAACACATCCACGACCCAGCAAAATGAAATACGGCAGA													
MV17	GGG CAGGCGTTTATCCAGACAACAAATGCGGCTGGCATGACCCAGCGAGCACTGCCAGGACCTCACAAATGTGCCGAGACAACAAATTAACACATCCACGACCCAGCAAAATGAAATACGGCAGA													
N-80-6	GGG CAGGCGTTTATCCAGACAACAAATGCGGCTGGCATGACCCAGCGAGCACTGCCAGGACCTCACAAATGTGCCGAGACAACAAATTAACACATCCACGACCCAGCAAAATGAAATACGGCAGA													
MKH3	GGG CAGGCGTTTATCCAGACAACAAATGCGGCTGGCATGACCCAGCGAGCACTGCCAGGACCTCACAAATGTGCCGAGACAACAAATTAACACATCCACGACCCAGCAAAATGAAATACGGCAGA													
MKH4	GGG CAGGCGTTTATCCAGACAACAAATGCGGCTGGCATGACCCAGCGAGCACTGCCAGGACCTCACAAATGTGCCGAGACAACAAATTAACACATCCACGACCCAGCAAAATGAAATACGGCAGA													
Consensus	GGG CAGGCGTTTATCCAGACAACAAATGCGGCTGGCATGACCCAGCGAGCACTGCCAGGACCTCACAAATGTGCCGAGACAACAAATTAACACATCCACGACCCAGCAAAATGAAATACGGCAGA													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
Bolani	CAATCATACCGAGCCGACACTTCACCTCCCGCTGAATGCGCCTCTCATGCCCATTTGACCCGGCTAGTTGTGCGGAGTTCTCGCCGTCACCCGCAATGGAACTGCAGCAGCCTGGATTCAAGAGA													
Boloelica	CAATCATACCGAGCCGACACTTCACCTCCCGCTGAATGCGCCTCTCATGCCCATTTGACCCGGCTAGTTGTGCGGAGTTCTCGCCGTCACCCGCAATGGAACTGCAGCAGCCTGGATTCAAGAGA													
Pishtaze	CAATCATACCGAGCCGACACTTCACCTCCCGCTGAATGCGCCTCTCATGCCCATTTGACCCGGCTAGTTGTGCGGAGTTCTCGCCGTCACCCGCAATGGAACTGCAGCAGCCTGGATTCAAGAGA													
MV17	CAATCATACCGAGCCGACACTTCACCTCCCGCTGAATGCGCCTCTCATGCCCATTTGACCCGGCTAGTTGTGCGGAGTTCTCGCCGTCACCCGCAATGGAACTGCAGCAGCCTGGATTCAAGAGA													
N-80-6	CAATCATACCGAGCCGACACTTCACCTCCCGCTGAATGCGCCTCTCATGCCCATTTGACCCGGCTAGTTGTGCGGAGTTCTCGCCGTCACCCGCAATGGAACTGCAGCAGCCTGGATTCAAGAGA													
MKH3	CAATCATACCGAGCCGACACTTCACCTCCCGCTGAATGCGCCTCTCATGCCCATTTGACCCGGCTAGTTGTGCGGAGTTCTCGCCGTCACCCGCAATGGAACTGCAGCAGCCTGGATTCAAGAGA													
MKH4	CAATCATACCGAGCCGACACTTCACCTCCCGCTGAATGCGCCTCTCATGCCCATTTGACCCGGCTAGTTGTGCGGAGTTCTCGCCGTCACCCGCAATGGAACTGCAGCAGCCTGGATTCAAGAGA													
Consensus	CAATCATACCGAGCCGACACTTCACCTCCCGCTGAATGCGCCTCTCATGCCCATTTGACCCGGCTAGTTGTGCGGAGTTCTCGCCGTCACCCGCAATGGAACTGCAGCAGCCTGGATTCAAGAGA													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
Bolani	ACATACAAATCGTAGTGAAGTGC TGAAGTGGACATAGATATATGTCCTTTGTTTCATTTGACGGTCAGATATAC TACCAGGCTGC													
Boloelica	ACATACAAATCGTAGTGAAGTGC TGAAGTGGACATAGATATATGTCCTTTGTTTCATTTGACGGTCAGATATAC TACCAGGCTGC													
Pishtaze	ACATACAAATCGTAGTGAAGTGC TGAAGTGGACATAGATATATGTCCTTTGTTTCATTTGACGGTCAGATATAC TACCAGGCTGC													
MV17	ACATACAAATCGTAGTGAAGTGC TGAAGTGGACATAGATATATGTCCTTTGTTTCATTTGACGGTCAGATATAC TACCAGGCTGC													
N-80-6	ACATACAAATCGTAGTGAAGTGC TGAAGTGGACATAGATATATGTCCTTTGTTTCATTTGACGGTCAGATATAC TACCAGGCTGC													
MKH3	ACATACAAATCGTAGTGAAGTGC TGAAGTGGACATAGATATATGTCCTTTGTTTCATTTGACGGTCAGATATAC TACCAGGCTGC													
MKH4	ACATACAAATCGTAGTGAAGTGC TGAAGTGGACATAGATATATGTCCTTTGTTTCATTTGACGGTCAGATATAC TACCAGGCTGC													
Consensus	ACATACAAATCGTAGTGAAGTGC TGAAGTGGACATAGATATATGTCCTTTGTTTCATTTGACGGTCAGATATAC TACCAGGCTGC													
	391396  ----													
Bolani	CACGAA													
Boloelica	CACGAA													
Pishtaze	CACGAA													
MV17	CACGAA													
N-80-6	CACGAA													
MKH3	CACGAA													
MKH4	CACGAA													
Consensus	cacgaa													

شکل ۲- توالی هم‌ردیف شده ژن *Lr47* (۳۹۶ جفت‌باز) در لاین‌های گندم مورد مطالعه. جایگاه‌های چند شکل در توالی اجمالی با حروف کوچک نشان داده شده است.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	121
Bolani	MNQRALPRTSQMCRDNKLTHSTTRPNEYGRQIITQPTLHPPAECASSCPAPGHRLFMPHCTGLVYVGLAVNRQMNCCSLDSREHTNRK												
Boloelica	MNQRALPRTSQMCRDNKLTHSTTRPNEYGRQIITQPTLHPPAECASSCPAPGHRLFMPHCTGLVYVGLAVNRQMNCCSLDSREHTNRKMLPLFLFDGQITYQAAVQLQVEHLKVTASLT												
Pishtaze	MNQRALPRTSQMCRDNKLTHSTTRPNEYGRQIITQPTLHPPAECASSCPAPGHRLFMPHCTGLVYVGLAVNRQMNCCSLDSREHTNRKMLPLFLFDGQITYQAAVQLQVEHLKVTASLT												
N-80-6	MNQRALPRTSQMCRDNKLTHSTTRPNEYGRQIITQPTLHPPAECASSCPAPGHRLFMPHCTGLVYVGLAVNRQMNCCSLDSREHTNRKMLPLFLFDGQITYQAAVQLQVEHLKVTASLT												
MV-17	MNQRALPRTSQMCRDNKLTHSTTRPNEYGRQIITQPTLHPPAECASSCPAPGHRLFMPHCTGLVYVGLAVNRQMNCCSLDSREHTNRKMLPLFLFDGQITYQAAVQLQVEHLKVTASLT												
MKH3	MNQRALPRTSQMCRDNKLTHSTTRPNEYGRQIITQPTLHPPAECASSCPAPGHRLFMPHCTGLVYVGLAVNRQMNCCSLDSREHTNRKMLPLFLFDGQITYQAAVQLQVEHLKVTASLT												
MKH4	MNQRALPRTSQMCRDNKLTHSTTRPNEYGRQIITQPTLHPPAECASSCPAPGHRLFMPHCTGLVYVGLAVNRQMNCCSLDSREHTNRKMLPLFLFDGQITYQAAVQLQVEHLKVTASLT												
Consensus	MNQRALPRTSQMCRDNKLTHSTTRPNEYGRQIITQPTLHPPAECASSCPAPGHRLFMPHCTGLVYVGLAVNRQMNCCSLDSREHTNRKMLPLFLFDGQITYQAAVQLQVEHLKVTASLT												

شکل ۳ - توالی‌های اسید آمینه‌ای رمز شده توسط ژن *Lr47* در هفت لاین گندم نان.

جدول ۴- میزان شباهت، مشخصات و شماره دسترسی توالی‌های NCBI هم‌ردیف شده با توالی ژن *Lr47*

شبهات (%) Identity (%)	مشخصات توالی Sequence information	شماره دسترسی ID number
99	<i>Triticum aestivum</i> partial ss1 gene for putative sucrose synthase, exon 1	<a href="#">AJ249623.1</a>
98	<i>Triticum aestivum</i> ss1 gene (partial), exons 1–2, sequence ID pS11	<a href="#">AJ238219.1</a>
93	<i>Triticum aestivum</i> ss1 gene (partial), exons 1–2 sequence ID pS7	<a href="#">AJ238218.1</a>
92	<i>Triticum speltoides</i> ss1 gene (partial), exons 1–2, sequence ID pS10	<a href="#">AJ238217.1</a>
94	<i>Triticum aestivum</i> mRNA for sucrose synthase type I	<a href="#">AJ001117.1</a>
94	<i>Triticum aestivum</i> sucrose synthase type 1 mRNA, 3' end	<a href="#">M26671.1</a>
93	<i>Triticum aestivum</i> partial ss1 for putative sucrose synthase, exon 1, clone pI2	<a href="#">AJ249624.1</a>

جایگزینی‌های غیر هم‌نام/ جایگزینی‌های هم‌نام نمایانگر وجود فشار گزینشی روی یک ناحیه می‌باشد. چنانچه گزینش غالبی روی یک ناحیه صورت نگیرد، این نسبت برابر یک خواهد بود. اکثر توالی‌هایی که تحت فشار گزینشی هستند برعلیه جهش‌های مضر گزینش می‌شوند و نسبت Ka/Ks آن‌ها کوچکتر از یک می‌باشد (هیوس و نی ۱۹۸۸).

#### ژن *Lr29*

قطعه‌ای به طول ۱۶۰ جفت باز از ژن *Lr29* با استفاده از آغازگرهای Lr29F18/Lr29R18 تکثیر شد (شکل ۴). این آغازگرها توسط پروکونیر (۲۰۰۴) براساس یک نشانگر RAPD طراحی شده است. ویدا و همکاران (۲۰۰۹) از این آغازگرها برای هرمی کردن ژن *Lr29* همراه با ژن‌های *Lr9*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr35* و *Lr37* در چهار رقم مجاری استفاده کردند. آنها با استفاده از جفت آغازگر Lr29-18 قطعه‌ای با اندازه ۱۰۰۰ جفت باز در لاین‌های حامل ژن *Lr29* تکثیر کردند. بنابراین، تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۶۰ جفت باز در لاین‌های مورد ارزیابی در مطالعه ما ممکن است به علت عدم وجود این ژن در آن‌ها و یا وقوع حذف شدگی بزرگ در ژن *Lr29* باشد.

در مقایسه با ژن *Lr47* هم‌ردیفی توالی ژن

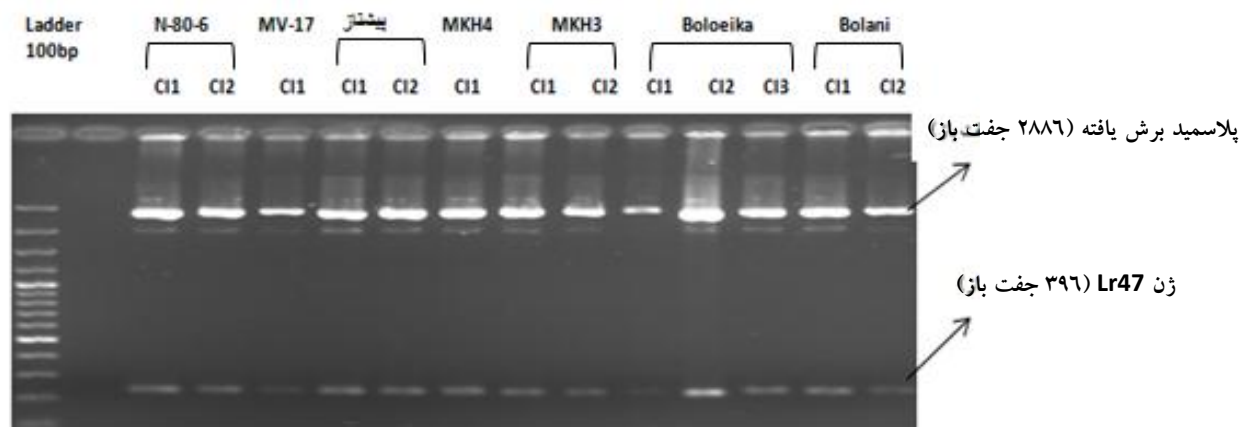
ترجمه توالی ژن *Lr47* به توالی‌های اسید آمینه‌ای نشان دهنده پنج چارچوب قرائت آزاد (ORF<sup>۱</sup>) در آن بود و دومین دامنه ایجاد شده، پروتئینی با ۳۷ اسید آمینه رمز می‌کرد (شکل ۳). این پروتئین از نظر ساختار اولیه دارای ۳۶٪ شباهت با آگلوتینین جوانه گندم WGA7 بود که یک نوع پروتئین ضد میکروبی در گیاهان است. بر اساس توالی‌های پروتئینی هم‌ردیف شده، رقم بولانی یک دامنه پروتئینی کمتر داشت. میزان جایگزینی‌های هم‌نام (Ks) و غیر هم‌نام (Ka) در ژن *Lr47* به ترتیب برابر با ۰/۰۰۳۷ و ۰/۰۳۹۷ با نسبت Ka/Ks (جایگزینی‌های غیر هم‌نام/ جایگزینی‌های هم‌نام) مساوی ۰/۰۹۲۵ برآورد شد. نسبت Ka/Ks کوچکتر از یک، نشان دهنده گزینش منفی<sup>۲</sup> برای جایگزینی یک اسید آمینه در این ناحیه از ژن *Lr47* می‌باشد. این حالت در جهت حذف جایگزینی‌های نامطلوب اتفاق می‌افتد. جایگزینی هم‌نام، تغییر در کدون رمزگردان اسید آمینه است که باعث تغییر در نوع اسید آمینه رمز شونده نمی‌شود. ولی در جایگزینی غیر هم‌نام تغییر در کدون باعث تغییر در نوع اسید آمینه رمز شونده می‌شود. تغییرات اسید آمینه‌ای ممکن است عملکرد و ساختار پروتئین‌ها را تغییر دهد. نسبت

<sup>۱</sup>Open reading frame

<sup>۲</sup>Negative (purifying) selection

گندم نان در گونه‌های گندم، یعنی *T. urartu*، دهنده ژنوم A و *A. tauschii*، دهنده ژنوم D و *T. turgidum*، دهنده ژنوم A و B به گندم هگزاپلوئید بدست آمده است. در این مطالعات از *T. urartu* دو شبه ژن مربوط به ACC-2 در جایگاه‌های ACC-1 و ACC-2 جداسازی و توالی‌یابی شده است (چالوپسکا و همکاران ۲۰۰۸). همتی و همکاران (۱۳۸۹) نیز شباهت ۸۷ درصدی ژن *Lr35* را با ژن گلوٲتین A با وزن مولکولی بالا از *T. turgidum* و ۸۴ درصدی با ژن پلاستییدی استیل کوآنزیم A آکربوکسیلاز (*ACC-1*) از *T. turgidum* را گزارش کردند.

*Lr29* در لاین‌ها نشان دهنده وجود چند شکلی تک نوکلئوتیدی بیشتری بود. بطوریکه ۲۴ SNP و چهار فقدان تک نوکلئوتیدی در توالی این ژن در هفت لاین گندم مشاهده شد (شکل ۵). تنوع نوکلئوتیدی در این قطعه برابر با ۰/۰۵۸۹ برآورد شد. جستجوی توالی‌های مشابه با این توالی در NCBI نشان‌دهنده شباهت ۹۱ درصدی آن با ژن *ACC-1* از گندم نان و شباهت ۹۰ درصدی با همین ژن از *Agillops tauschii* بود (جدول ۵). ژن *ACC-1* رمزکننده نوع پلاستییدی آنزیم استیل کوآنزیم A کربوکسیلاز (*ACC*) می‌باشد. توالی ژن *ACC-1* در مطالعات تعیین منشأ سه ژنوم



شکل ۴- الگوی نواری پلاسمیدهای برش‌یافته با آنزیم‌های *EcoRI* و *HindIII* پلاسمید با طول ۲۸۸۶ جفت‌باز و قطعه درجی ژن *Lr29* با طول ۱۶۳ جفت‌باز. در رقم بولوتیکا از سه کلون استفاده شد و برای توالی‌یابی، کلونی‌هایی با نوار واضح‌تر انتخاب گردید. (*cl* خلاصه colony می‌باشد).

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	
Bolani	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----														
pishtaze	GTGACCTCAGGC	CAATGCACACAGT	TTTAGGAA	TAAACCGT	GTTGATCAATGA	CAATCACACACGACT	TCTCTTGA	AAACTGTTT	GTGATTAGGC	CACCTTGC	CAACGTTT	ACCACATA	AAAA	CT	
MV17	GTGACCTCAGGC	CAATGCACACAGT	TTTAGGAA	TAAACCGT	GTTGATCAATGA	CAATCACACACGACT	TCTCTTGA	AAACTGTTT	GTGATTAGGC	CACCTTGC	CAACGTTT	ACCACATA	AAAA	CT	
N-80-6	GTGACCTCAGGC	CAATGCACACAGT	TTTAGGAA	TAAACCGT	GTTGATCAATGA	CAATCACACACGACT	TCTCTTGA	AAACTGTTT	GTGATTAGGC	CACCTTGC	CAACGTTT	ACCACATA	AAAA	CT	
MKH3	GTGACCTCAGGC	CAATGCACACAGT	TTTAGGAA	TAAACCGT	GTTGATCAATGA	CAATCACACACGACT	TCTCTTGA	AAACTGTTT	GTGATTAGGC	CACCTTGC	CAACGTTT	ACCACATA	AAAA	CT	
MKH4	GTGACCTCAGGC	CAATGCACACAGT	TTTAGGAA	TAAACCGT	GTTGATCAATGA	CAATCACACACGACT	TCTCTTGA	AAACTGTTT	GTGATTAGGC	CACCTTGC	CAACGTTT	ACCACATA	AAAA	CT	
Boloeika	GTGACCTCAGGC	CAATGCACACAGT	TTTAGGAA	TAAACCGT	GTTGATCAATGA	CAATCACACACGACT	TCTCTTGA	AAACTGTTT	GTGATTAGGC	CACCTTGC	CAACGTTT	ACCACATA	AAAA	CT	
Consensus	GTGACCTCAGGC	CAATGCACACAGT	TTTAGGAA	TAAACCGT	GTTGATCAATGA	CAATCACACGACT	TCTCTTGA	AAACTGTTT	GTGATTAGGC	CACCTTGC	CAACGTTT	ACCACATA	AAAA	CT	
	131	140	150	160	163										
Bolani	----- ----- ----- ----- -----														
pishtaze	GTGTGTGATGG	ACATCGGTTCT	GAGGTCACAA												
MV17	GTGTGTGATGG	ACATCGGTTCT	GAGGTCACAA												
N-80-6	CTGTGTGATGG	ACATCGGTTCT	GAGGTCACAA												
MKH3	GTGTGTGATGG	ACATCGGTTCT	GAGGTCACAA												
MKH4	GTGTGTGATGG	ACATCGGTTCT	GAGGTCACAA												
Boloeika	GTGTGTGATGG	ACATCGGTTCT	GAGGTCACAA												
Consensus	gTGTGTGATGG	ACATCGGTTCT	GAGGTCACAA												

شکل ۵- توالی هم‌ردیف شده ژن *Lr29* (۱۶۳ جفت‌باز) در لاین‌های گندم مورد مطالعه.



جدول ۵- میزان شباهت، مشخصات و شماره دسترسی توالی‌های NCBI هم‌ردیف شده با توالی ژن *Lr29*

شماره دسترسی	مشخصات توالی	شباهت (%)
ID number	Sequence information	Identity (%)
<u>EU660902.1</u>	<i>Triticum aestivum</i> clone BAC 122F14 plastid acetyl-CoA carboxylase (Acc-1) gene, complete cds; nuclear gene for plastid product	91
<u>EU660897.1</u>	<i>Aegilops tauschii</i> clone BAC RI43D6 hypothetical protein and plastid acetyl-CoA carboxylase (Acc-1) genes, complete cds	90
<u>AC119411.16</u>	<i>Medicago truncatula</i> clone mth2-23c14, complete sequence	90

جدول ۶- میزان جایگزینی‌های همنام (Ks) و غیرهمنام (Ka) و نسبت آن‌ها در ژن‌های *Lr29* و *Lr47*

a تنوع نوکلئوتیدی Nucleotide diversity	Ka/Ks <sup>b</sup>	جایگزینی غیرهمنام Non-synonymous Substitution		ژن
		جایگزینی همنام Synonymous substitution	ژن	
0.0589	1.1879	0.2093	0.2132	<i>Lr29</i>
0.0041	0.092	0.0397	0.0037	<i>Lr47</i>

a میانگین تنوع نوکلئوتیدی در همه جفت مقایسات، b میانگین Ka/Ks در همه جفت مقایسات.

معنی‌داری متفاوت می‌باشد. آن‌ها در کل ناحیه LRR نسبت معنی‌داری از  $Ka > Ks$  در چهار ژن *L*، *P*، *RPP13* و *RPP8* را شناسایی کردند که نشان می‌دهد موتیف LRR در برخی از ژن‌های مقاومت تحت فشار گزینشی در جهت ایجاد تنوع قرار گرفته است.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که طراحی آغازگر براساس توالی ژن *Lr47* تعیین شده در بررسی حاضر می‌تواند ارقام حساس به زنگ قهوه‌ای مانند بولانی را که دارای حذف شدگی در انتهای ۳' غیر رمز کننده این ژن هستند از سایر ارقام تفکیک نماید. با توجه به وجود پنج SNP در لاین‌ها از نظر توالی ژن *Lr47*، آغازگرهای طراحی شده براساس این SNP ها نیز ممکن است در تمایز ارقام مقاوم و حساس موثر واقع شوند. ولی برای اطمینان از کارایی این نوع آغازگرها، بهتر است در ارقام مقاوم و حساس بیشتری آزمون شوند.

#### سپاس‌گزاری

این تحقیق در آزمایشگاه ژنومیک و اصلاح نباتات مولکولی و با حمایت مالی قطب علمی اصلاح مولکولی

تجزیه توالی‌ها نشان دهنده یک چارچوب قرائت آزاد در توالی ژن *Lr29* با ۹۶ جفت‌باز بود که پروتئینی با ۳۳ اسیدآمینا را رمز می‌کرد. میزان جایگزینی‌های همنام و غیر همنام در ژن *Lr29* به ترتیب برابر با ۰/۲۱۳۲ و ۰/۲۰۹۳ برآورد شد. نسبت جایگزینی‌های غیر همنام/ جایگزینی‌های همنام مساوی ۱/۱۸۷۹ و بیشتر از یک بود (جدول ۶). این امر نشان می‌دهد که گزینش مثبت یا گزینش در جهت ایجاد تنوع<sup>۱</sup> برای جایگزینی یک اسیدآمینا انجام شده است. این حالت گاهی اوقات در پروتئین‌های آنتی‌ژنی رمز شده بوسیله پاتوژن‌ها مشاهده می‌شود که تحت فشار گزینشی قوی در جهت ایجاد تغییر به منظور اجتناب از واکنش‌های ایمنی در میزبان و برای تثبیت جایگزینی‌های مطلوب صورت می‌گیرد (نکروتکو و همکاران ۲۰۰۲). جیانگ و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی تنوع نوکلئوتیدی ناحیه LRR در ژن‌های مقاومت گیاهان گزارش کردند که میزان تنوع نوکلئوتیدی و نسبت جایگزینی‌های غیر همنام/ جایگزینی‌های همنام در موتیف‌ها LRR بطور

<sup>1</sup>Positive (diversifying) selection

غلالت دانشگاه تبریز انجام شد. بدین وسیله از آقای دکتر  
منوچهر خدارحمی، عضو هیات علمی بخش غلات  
موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر برای فراهم  
کردن بذور ژنوتیپ‌های مورد مطالعه سپاسگزاری می-  
شود.

## منابع

همتی گوگه ر، محمدی س ا و اهری زاد س، ۱۳۸۹. تغییرات ساختاری ژن مقاومت به زنگ قهوه ای *Lr35* در ژنوتیپ های مقاوم و حساس گندم نان (*Triticum aestivum* L). مجله علوم زراعی ایران، شماره ۴، صفحات: ۵۰۹-۴۴۹.

Birnboim HC and Doly J, 1979. A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research 7: 1513-1523.

Blaszczyk L, Chelkowski J, Korzun V, Kraič J, Ordon F, Ovesná J, Purnhauser L, Tar M and Vida G, 2004. Verification of STS markers for leaf rust resistance genes of wheat by seven European laboratories. Cellular and Molecular Biology Letters 9: 805- 817.

Brevis JC, Chicaiza O, Khan IA, Jackson L, Morris CF and Dubcovsky J, 2008. Agronomic and quality evaluation of common wheat near-isogenic lines carrying the leaf rust resistance gene *Lr47*. Crop Science 48: 1441-1451.

Chalupska D, Lee HY, Faris JD, Evrard A, Chalhoub B, Haselkorn R and Gornicki P, 2008. Acchomoeoloci and the evolution of wheat genomes. Proceeding of Natural Academic Science USA 105: 9691-9696.

CIMMYT 2005. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. 3<sup>rd</sup> Ed., Mexico, D.F., CIMMYT.

Cloutier SY, Mccallum BD, Loutre C, Banks TW, Wicker T, Feuillet C, Keller B and 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.

Dubcovsky J, Echaide M, Antonelli EF and Lukaszewski AJ, 1998. Molecular characterization of two *Triticum speltoides* interstitial translocations carrying leaf rust and green bug resistance genes. Crop Science 38: 1655-1660.

Elyasi-Gomari S, 2010. Virulence of *Puccinia triticina* on wheat in Iran. African Journal of Plant Science 4: 26-31.

FAO, 2009. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org>.

Feuillet C, Travella S, Stein N, Albar L, Nublát A and Keller B, 2003. Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. Proceeding of Natural Academic Science USA 100: 15253-15258.

Gál M, Vida G, Uhrin A, Bedő Z and Veisz O, 2007. Incorporation of leaf rust resistance genes into winter wheat genotypes using marker-assisted selection. Acta Agronomica Hungarica 55: 149-156.

Helguera M, Khan JA and Dubcovsky J, 2000. Development of PCR markers for the wheat leaf rust resistance gene *Lr47*. Theoretical Applied Genetics 100: 1137-1143.

Hughes AL and Nei M, 1988. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals over dominant selection. Nature 335: 167-170.

Jiang H, Wang C, Ping L, Tian D and 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 Phytopathology 34: 435-455.

- Labuschagne MT, Pretorius ZA and Grobbelaar B, 2002. The influence of leaf rust resistance genes *Lr29*, *Lr34*, *Lr35* and *Lr37* on bread making quality in wheat. *Euphytica* 124: 65-70.
- Marasas CN, Smale M and Singh RP, 2004. The economic impact in developing countries of leaf rust resistance breeding in CIMMYT-Related spring bread wheat. Economics Program Paper 04-01. Mexico, D.F.: CIMMYT.
- McIntosh RA, Dubcovsky J, Rogers WJ, Morris C, Appels R and Xia XC, 2009. Catalogue of gene symbols for wheat: 2009 supplement. KOMUGI Integrated Wheat Science database. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/download.jsp> (verified 23 July 2010). Wheat Genetic Resource Database Komugi-Natl. BioResource Res. Project, Japan.
- Nekrutenko A, Makova KD and Li WH, 2002. The Ka/Ks ratio test for assessing the protein-coding potential of genomic regions: an empirical and simulation study. *Genome Reserach* 12: 198-202.
- Procnier D, 2004. Disease resistance. Leaf rust resistance *Lr29* - *Lr25*. <http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr29>.
- Qiu JW, Schurch AC, Yahiaoui N, Dong LL, Fan HJ, Zhang ZJ, Keller B and Ling HQ, 2007. Physical mapping and identification of a candidate for the leaf rust resistance gene *Lr1* of wheat. *Theoretical Applied Genetics* 115: 159-168.
- Rajaram S, 2005. Role of conventional plant breeding and biotechnology in future wheat production. *Turkish Journal of Agriculture* 29: 105-111.
- Rozas J and Rozas R, 1998. Dnasp version 3: An integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics Application Note* 15: 174-175.
- Saghai-Marooif MA, Soliman K, Jorgensen RA and Allard RW, 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. *Proceeding of Natural Academic Science USA* 81: 8014-8018.
- Singh A, Pallavi JK, Gupta P and Prabhu KV, 2011. Identification of microsatellite markers linked to leaf rust adult plant resistance (APR) gene *Lr48* in wheat. *Plant Breeding* 130: 31-34.
- Tar M, Punhauser L, Csoz L, Mesterhazy A and Gyulai G, 2002. Identification of molecular markers for an efficient leaf rust resistance gene *Lr29* in wheat. *Plant Physiology* 46: 133-13.
- Vahabzadeh M and Mahfoozi S, 2011. Irrigated winter and facultative wheat research and production in Iran. Abstract Book, 1<sup>st</sup> Regional Winter Wheat Symposium, 25-27 June, 2011, Tabriz, Iran, pp. 42-43.
- Vanzetti LS, Brevis JC, Dubcovsky J and Helguera M, 2006. Identification of microsatellites linked to *Lr47*. *Journal of Biotechnology* 9: 267-271.
- Vida G, Gál M, Uhrin A, Veisz O, Syed NH, Flavell AJ, Wang Z and Bedő Z, 2009. Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance. *Euphytica* 170: 67-76.
- William HM, Singh RP, Trethowan R, Ginkel M, Pellegrinshi A, Huerta-Espino J and Hoisington D, 2005. Biotechnology applications for wheat improvement at CIMMYT. *Turkish Journal of Agriculture* 29: 113-119.

## Nucleotide Diversity of Leaf Rusts Resistance Genes *Lr29* and *Lr47* Genomic Regions in Bread Wheat Lines (*Triticum aestivum* L.)

SA Mohammadi<sup>1\*</sup>, R Hemati Ghogheh<sup>2</sup> and S Aharizad<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.

<sup>2</sup>Former MSc, Student of Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding, and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.

<sup>3</sup>Associate Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

\*Corresponding author: [mohammadi@tabrizu.ac.ir](mailto:mohammadi@tabrizu.ac.ir)

Received: 04 May 2014

Accepted: 18 Dec 2014

### Abstract

Leaf rust is one of the important wheat diseases which damages its production. Development of resistant varieties is an effective, environmentally friendly and low costly method for reducing disease damage. The aim of this study was to isolate and sequence *Lr29* and *Lr47* genes transferred to wheat from *Agropyron elongatum* and *Triticum speltoides*, respectively, in seven wheat lines with different levels of resistance to leaf rust. Using a specific primer pair, a fragment with length of 396 bp was isolated and sequenced from *Lr47* gene in the studied lines having five open reading frames (ORF). The second ORF encoded a protein with length of 37 amino acids which showed 36% homology with wheat agglutinin antimicrobial protein. Alignment of the *Lr47* sequence with NCBI data revealed 99% homology with *Triticuma estivum* sucrose synthase type I gene sequence. Nucleotide diversity of *Lr47* gene was 0.0041 and five single nucleotide polymorphism were identified among the seven lines. Bolani showed a large deletion with length of 48 nucleotide at 3' non-coding end of the gene which could differentiate this line from the others. The length of isolated fragment from *Lr29* gene was 160 bp which showed 91 and 90% similarity with acetyl CoA carboxylase gene from wheat and *Aegilop stauschii*, respectively. Twenty eight single nucleotide substitutions with nucleotide diversity of 0.0589 were detected in *Lr29* gene. Synonymous/non synonymous substitution ratio in *Lr47* and *Lr29* gene indicated negative and positive selection in the studied line for these genes, respectively.

**Keywords:** Bread wheat, Leaf rust, Open reading frame, Synonymous and non-synonymous substitution.