Crop Biotech.
Autumn and Winter (2013) 5: 129-138

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره پنجم، پائیز و زمستان ۱۳۹۲ (۱۳۸- ۱۲۹)

شناسایی ژن‌های مقاومت به زنگ‌های گندم (*Lr26*، *Sr31* و *Yr9*) با استفاده از PCR اختصاصی

سعید باقری‌کیا[۱]، قاسم کریم‌زاده[۱*] و محمدرضا نقوی[۲]

۱، دانشجوی کارشناسی‌ارشد و دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران. ص‌پ ۳۳۶-۱۴۱۱۵،
۲، استاد گروه زراعت و اصلاح‌نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۲۹- تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۱۰/۴)

Identification of Rust-Resistance Genes (*Lr26*, *Sr31*, *Yr9*) Using Specific PCR

S. BAGHERIKIA[1], G. KARIMZADEH[1]* and M. R. NAGHAVI[2]
1, M.Sc. Student and Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, P. O. Box 14115-336, Iran, 2, Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agricultural and Natural Resources , University of Tehran, Karaj, Iran.
(Received: Oct. 21, 2013 - Accepted: Dec. 25, 2013)

چکیده

بازوی کروموزومی 1RS چاودار (*Secale cereale* L.) منبع با ارزشی برای بهبود ویژگی‌های گندم (*Triticum aestivum* L.) است که با بازوی کوتاه کروموزوم گروه ۱ گندم جابجا شده است (1AL.1RS, 1BL.1RS, 1DL.1RS). این بازو ژن‌های مقاومت به زنگ؛ *Lr26* برای زنگ قهوه‌ای (*Puccinia triticina*)، *Sr31* برای زنگ سیاه (*P. graminis*) و *Yr9* برای زنگ زرد (*P. striiformis*) را حمل می‌کند. این ژن‌ها در فاصله ۶/۶ سانتی‌مورگانی از *Sec-1* قرار دارند. این پیوستگی نزدیک به‌عنوان نشانگری برای شناسایی ژن‌های مقاومت به زنگ استفاده می‌شود. در این آزمایش حضور *Sec-1*، با استفاده از نشانگر اختصاصی چاودار O-SEC در گندم نان ۶۶ رقم ایرانی و ۷۰ اکسیشن بومی خارجی مورد بررسی قرار گرفت. ژن‌های مقاومت به زنگ‌های فوق به‌واسطه حضور *Sec-1*، در ۱۵ (۲۳٪) رقم ایرانی و ۲ (۳٪) اکسیشن خارجی مورد تأیید قرار گرفت. علاوه بر این از آن جایی‌که نشانگر اختصاصی O-SEC می‌تواند جابجایی‌های 1AL.1RS و 1BL.1RS را تشخیص دهد، وجود ژن‌های فوق در کروموزوم 1B، ۱۴ (۲۱٪) رقم گندم ایرانی و ۲ (۳٪) اکسیشن خارجی شناسایی شد. همچنین از میان همه ارقام و اکسیشن‌ها وجود ژن‌های مقاومت در کروموزوم 1A رقم شعله تأیید شد. به طور کلی حضور ژن‌های مقاومت به زنگ در گندم‌های ایرانی بیشتر از اکسیشن‌های خارجی گندم مشاهده شد زیرا بسیاری از گندم‌های ایرانی تجاری هستند و در شجره آن‌ها ارقام حامل ژن‌های مقاومت به زنگ‌ها وجود دارند. از نتایج این تحقیق می‌توان در تولید ارقام جدید گندم در برنامه‌های اصلاحی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: ژن‌های مقاومت به زنگ، نشانگر اختصاصی چاودار، *Triticum aestivum*، *Secale cereale*

Abstract

The chromosomal arm 1RS of rye (*Secale cereale* L.) is a valuable resource for improving the properties of wheat (*Triticum aestivum* L.) which has been translocated with the short arm of a wheat group-1 chromosome (1AL.1RS, 1BL.1RS, 1DL.1RS). This arm carries rust resistance genes; *Lr26* for leaf rust (*Puccinia triticina*), *Sr31* stem rust (*P. graminis*) and *Yr9* for stripe rust (*P. striiformis*). These genes were located 6.6 cM from the *Sec-1*. This close linkage has been used as a marker for identification of rust resistance genes. In this study, the presence of *Sec-1* was examined in 66 Iranian cultivars and 70 abroad regional accessions, using rye-specific primer "O-SEC". The rust resistance gene by the presence of *Sec-1* was verified in 15 (23%) Iranian cultivars and 2 (3%) abroad accessions. Moreover, because of the rye-specific primer can distinguish between 1AL.1RS and 1BL.1RS translocations, the presence of these genes were identified in 14 (21%) cultivars and 2 (3%) abroad accessions in chromosome 1B. Also among all cultivars and accessions, the presence of the resistance genes was verified in chromosome 1A of "Sholeh" cultivar (1.5%). On the whole, the presence of rust resistance genes in Iranian wheat cultivars appeared to be better than abroad wheat accessions. This is because many Iranian wheat materials are commercial cultivars and in their pedigree have cultivars carrying rust resistance genes. The results of this study can be used for the production of new wheat cultivars in breeding programs.

Keywords: Rust resistance genes, Rye-specific primer, *Triticum aestivum*, *Secale cereale*

* نویسنده مسئول: قاسم کریم‌زاده
E-mail: karimzadeh_g@modares.ac.ir

مقدمه

اکثر بخش‌های بیگانه وارد شده به ژنوم گندم شامل مقاومت به آفات و بیماری است که از جنس‌های خویشاوند گندم از جمله چاودار مشتق شده است (Friebe, 1996). بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۱ چاودار (1RS) یکی از موفق‌ترین منابع خارجی استفاده برای بهبود ویژگی‌های گندم است و به طور گسترده‌ای در برنامه‌های اصلاحی جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. روی بازوی 1RS چاودار منابع با ارزشی برای بهبود ویژگی‌های گندم شناسایی شده است. این بازو به شکل‌های مختلفی (1AL.1RS, 1BL.1RS, 1DL.1RS) با کروموزوم‌های گندم جابجا شده است (Landjeva *et al*., 2006). گندم‌های حامل 1RS دارای مقاومت به بیماری‌های زنگ قهوه‌ای (*Puccinia triticina*) مربوط به ژن *Lr26*، زنگ سیاه (*P. graminis*) مربوط به ژن *Sr31*، زنگ زرد (*P. striiformis*) مربوط به ژن *Yr9* و سفیدک پودری (*Erysiphe graminis* DC) مربوط به ژن‌های *Pm8* و *Pm17* می‌باشند (Rabinovich, 1998; Weng *et al*., 2007). جایگاه ژنی *Sec-1* روی بازوی 1RS است که رمزکننده دو نوع پروتئین ذخیره‌ای دانه به نام‌های ω-secalins و γ-secalins 40K است (Jian Fang *et al*., 2005). در ارقام گندم حامل جابجایی 1BL.1RS ژن‌های مقاومت به زنگ *Lr26*، *Sr31* و *Yr9* در فاصله ۶/۶ سانتی‌مورگانی از *Sec-1* قرار دارند (Schlegel *et al*., 1998) که از این پیوستگی نزدیک به‌عنوان نشانگری برای شناسایی این ژن‌های مقاومت استفاده شده است (Afshari, 2006). از طرفی حضور جایگاه‌ژنی *Sec-1* بیانگر حضور سکالین چاودار در گندم است. علاوه بر این، از این ویژگی در شناسایی بازوی 1RS بر اساس محتوای پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه استفاده می‌شود (Berzonsky and Francki, 1999). وجود ژن‌های مقاومت به زنگ *Lr26*، *Sr31* و *Yr9* در برخی ارقام گندم نان ایران توسط شناسایی پروتئین *Sec-1* با استفاده از روش SDS-PAGE و نشانگر اختصاصی چاودار تأیید شده است (Afshari, 2006; Tabibzadeh *et al*., 2013). گزینش با کمک نشانگر روشی سریع و مطمئن برای شناسایی ژن‌های مقاومت در برنامه‌های اصلاحی گندم است (Weng *et al*., 2007). از این رو هدف ما در این پژوهش شناسایی جایگاه‌ژنی *Sec-1* به‌منظور تأیید حضور ژن‌های مقاومت به زنگ *Lr26*، *Sr31* و *Yr9* ناشی از حضور جابجایی 1AL.1RS و 1BL.1RS در برخی ارقام گندم نان بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور مورد استفاده در این پژوهش شامل ۳ دسته از مواد ژنتیکی گندم نان، شامل ارقام ایرانی، اکسیشن‌های[1] گندم نان خارجی و ارقام شاهد بین‌المللی بود. تعداد ۶۶ رقم گندم نان (*Triticum aestivum* L., 2*n*=6*x*=42) از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شد (جدول ۱). اکسیشن‌های گندم نان خارجی شامل ۶۰ اکسیشن از ۶ کشور همسایه ایران شامل افغانستان، پاکستان، ترکمنستان، آذربایجان، ترکیه و عراق (از هر کشور ۱۰ اکسیشن)، به‌علاوه ۱۰ اکسیشن از کشور سوریه بود که از بانک ژن مرکز بین‌المللی پژوهش کشاورزی در مناطق خشک[2] (ایکاردا) تهیه شدند (جدول ۲). ارقام شاهد بین‌المللی شامل گندم بهاره چینی[3] (*T. aestivum*) و TAM 105 به‌عنوان شاهد منفی فاقد 1RS، گندم Kavkaz (*T. aestivum*) به‌عنوان شاهد مثبت دارای جابجایی 1BL.1RS و گندم Tam 107 (*T. aestivum*) به‌عنوان شاهد مثبت دارای جابجایی 1AL.1RS تهیه‌شده از بانک‌ژن مرکز بین‌المللی پژوهش کشاورزی در مناطق خشک (ایکاردا) در سوریه بودند (جدول ۳). شاهد دیگر در این آزمایش رقم Insave چاودار (*Secale cereale* L., 2*n* = 2*x* = 14) بود که به‌عنوان شاهد مثبت هر دو نوع جابجایی به‌کار گرفته شد که از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه گردید. این بذور در گلخانه گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه تربیت مدرس کشت شدند.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

بررسی‌های مولکولی در آزمایشگاه‌های اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. استخراج DNA ژنومی از برگ‌های سبز و جوان گیاه با استفاده از روش CTAB با اندکی تغییر انجام شد (Doyle and Doyle, 1987). واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر دارای شیب دمایی و ساخت کمپانی Eppendorf، انجام گرفت. جفت آغازگر استفاده‌شده اختصاصی چاودار به‌نام O-

1. Accession
2. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas; ICARDA

SEC بود که براساس جایگاه‌ژنی Sec-1 طراحی شده است (Shimizu *et al*., 1997). توالی این آغازگر اختصاصی چاودار در جدول ۴ آمده است. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای نمونه‌ها در حجم ۲۵ µl محتوی ۲/۵ µl بافر ۱۰X، ۱/۵ mM کلریدمنیزیم، ۰/۴ µl Taq DNA Polymerase، ۱/۲ µl از هر آغازگر، ۰/۱ µl مخلوط نوکلئوتیدی به‌همراه ۵۰ ng از DNA ژنومی بود. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تحت شرایط دمایی ۹۵°C برای واشرشته‌سازی ابتدایی به‌مدت ۵ دقیقه، به دنبال آن ۳۵ چرخه دمای ۹۴°C برای ۶۰ ثانیه، ۵۰°C برای ۶۰ ثانیه و ۷۲°C برای ۳ دقیقه و در نهایت دمای ۷۲°C برای توسعه نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از پایان واکنش برای مشاهده محصول حاصل، الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ در بافر 1X TAE انجام گرفت و جهت نمایان‌کردن قطعات DNA در ژل از رنگ‌آمیزی اتیدیوم برماید و لامپ UV استفاده شد.

جدول ۱- مشخصات ارقام گندم نان ایرانی (*T. aestivum*) مورد استفاده در این پژوهش

ردیف	رقم	سال معرفی	شجره
۱	دز	۱۳۸۱	Kauz*2/Opata//Kauz
۲	اترک	۱۳۷۴	Kauz"s"-CIMMYT, Mexico
۳	رسول	۱۳۷۱	Veery"s"=Kvz/Buho"s"//Kal/Bb
۴	مغان ۳	۱۳۸۵	Luan/3/V763.23/V879.C8//Pvn/4/Picus/5 /Opata
۵	فلات	۱۳۶۹	KVZ/Buho"s"//Kal/Bb=seri82
۶	مهدوی	۱۳۷۴	TI/PCH/5MT48/3/WT*//Nar59/TOTA634/MUS
۷	الموت	۱۳۷۴	Kavz/Ti71/3/Maya"s"//Bb/Inia/4/Kj2/5/Anza/3/Pi/Ndr//Hys
۸	هامون	۱۳۸۱	Falat/Roshan
۹	کرج ۲	۱۳۵۲	(Fa*Th-Mt) Omid
۱۰	شهریار	۱۳۸۱	Kvz/Ti71/3/Maya"s"//Bb/Inia/4/Karaj2/5/Anza/3/Pi/Nar//Hys
۱۱	زاگرس	۱۳۷۵	Tan"s"/Vee"s"/Opata
۱۲	چمران	۱۳۷۶	Attila, CM85836-50Y-OM-OY-3M-OY
۱۳	شیرودی	۱۳۷۶	Attila, CM85836-4Y-OM-OY-8M-OY-OPZ
۱۴	سبلان	۱۳۶۰	(908FnA12)*1-32-4382
۱۵	تجن	۱۳۷۴	Bow"s"/Nkt"s"(CM67428-GM-LR-5M-3R-LB-Y), CIMMYT, Mexico
۱۶	طبسی	۱۳۳۰	Landrace from Tabas, Iran
۱۷	شعله	۱۳۳۶	Landrace from Ahvaz, Iran
۱۸	خزر ۱	۱۳۵۲	P4160(F3)*Nr(69)LR64
۱۹	توس	۱۳۸۱	"Spn/Mcd//Cama/3/Nzr"
۲۰	مارون	۱۳۷۰	Avd*Pchu((28mt54A*N10-Brv21-1c/Kt54B)Nar59,1093))7c
۲۱	لاینA	-	-
۲۲	بم	۱۳۸۵	Vee"s"/Nac//1-66-22
۲۳	مغان ۱	۱۳۵۲	LR-N10B*An3E
۲۴	مغان ۲	۱۳۵۳	Choti Lerma, landrace from India
۲۵	کرج ۳	۱۳۵۵	(Drc*Mxp/Son64*Tzpp-Y54)Nai60
۲۶	Mv_{17}	۱۳۷۲	Introduction Cultivar, Hungarian
۲۷	کاوه	۱۳۵۹	Fta-P1
۲۸	ویری ناک	۱۳۷۴	Veery/Nacozari
۲۹	سپاهان	۱۳۸۵	(Azd/5/L2453/1347/4/KaI//Bb/KaI/3/Au//Y50E/KaI*3)
۳۰	اروند	۱۳۵۲	Rsh(Mt-Ky*My48)

ادامه جدول ۱- مشخصات ارقام گندم نان ایرانی (*T. aestivum*) مورد استفاده در این پژوهش

ردیف	رقم	سال معرفی	شجره
۳۱	گاسکوژن	-	Introduction Cultivar, France
۳۲	شاه‌پسند	۱۳۲۱	Landrace from Save, Iran
۳۳	میهن	۱۳۸۹	Bkt/90-Zhong 87
۳۴	سایسون	۱۳۷۵	Introduction Cultivar, France
۳۵	آرتا	۱۳۸۵	-
۳۶	سرداری	بسیار قدیمی	Landrace from Kurdistan, Iran
۳۷	گاسپارد	۱۳۷۳	Introduction Cultivar, France
۳۸	دریا	۱۳۸۵	SHA4/CHILCM91099-25Y-OM-3N-1Y-OYZ-O10M-OY-3M-O10
۳۹	نیشابور	۱۳۸۷	1-63-31/3/12300 /Tob/Cno/Sx/
۴۰	کراس شاهی	۱۳۷۸	Shahi/Kvz/Shahi/4/Kal/Bb/Cj"s"/Hork"s"
۴۲	بزوستایا	۱۳۴۸	Introduction Cultivar, Russia
۴۲	اینیا ۶۶	۱۳۴۷	LR64/SN64
۴۳	بیات	۱۳۵۵	(C271*Wte-Son64)*CIR
۴۴	سرخ تخم	بسیار قدیمی	Landrace from Zabol, Iran
۴۵	کرج ۱	۱۳۵۲	(200H*Vfn)Rsh
۴۶	ارگ	۱۳۸۸	-
۴۷	بک‌کراس روشن بهاره	۱۳۷۷	10120/Rsh2
۴۸	بک کراس روشن زمستانه	۱۳۷۶	-
۴۹	چناب	۱۳۴۳	Introduction Cultivar, Pakistan
۵۰	سیستان	۱۳۸۶	-
۵۱	استار	۱۳۷۴	Mexico (LFN/SDY//PVN"S")
۵۲	عدل ۱	۱۳۴۱	Shahpasand*Turky
۵۳	زارع	۱۳۸۹	130L1.11//F35.70/Mo73/4/Ymh/Tob//Mcd/3/Lira CIT925080-0SE-0YC-7YC-0YC-1YC-0YC-3YC-0YC
۵۴	سیوند	۱۳۸۸	Kauz "s"* Azd
۵۵	اروم	۱۳۸۹	Alvand//NS732/Her
۵۶	پارسی	۱۳۸۸	Dove"S"/Buc"S"
۵۷	افلاک	۱۳۸۹	HD160/5/Tob/ Cno / 23854 /3/ Nai60//Tit/ Son64 /4/LR/ Son64
۵۸	امید	۱۳۳۵	Landrace from Saveh, Iran
۵۹	گهر	۱۳۷۵	Nd/Vg9144//Kal/Bb/3/Yaco
۶۰	پاستور	-	Fow/Seri//Bow"S"- CIMMYT
۶۱	کراس البرز	۱۳۸۹	47A/Alborz
۶۲	اوحدی	۱۳۸۹	Kc-2758 in National Plant Gene Bank of Iran
۶۳	رصد	۱۳۸۶	Fenkang 15*Sefid
۶۴	کوهدشت	۱۳۷۹	29R-1R-1R-6R-0R- Tr 8010200
۶۵	پیشگام	۱۳۸۷	Bkt/90-Zhong87
۶۶	بهار	۱۳۸۶	Bloyka (ICW84-0008-013AP-300L-3AP-300L) M-79-7=

جدول ۲- مشخصات اکسیشن‌های گندم نان خارجی مورد استفاده در این پژوهش

ردیف	کد شناسایی	منشأ	استان	طول جغرافیایی (درجه)	عرض جغرافیایی (درجه)	ارتفاع از سطح دریا (متر)
1	ICBW 41225	PAK	NWF	E072 12 54	N36 19	2260
2	ICBW 41257	PAK	NWF	E72 22	N36 16	2260
3	ICBW 41274	PAK	NWF	E072 21 12	N36 26 18	2320
4	ICBW 41550	PAK	Baluchistan	E067 00 36	N30 35 24	1500
5	ICBW 41556	PAK	Baluchistan	E066 40 12	N30 41 24	1440
6	ICBW 41790	PAK	Azad Kashmir	E073 37 27	N34 12 56	1090
7	ICBW 43196	PAK	Northern Areas	E074 34 41	N35 48 36	1300
8	ICBW 43232	PAK	Northern Areas	E073 28 48	N36 13 12	1970
9	ICBW 43247	PAK	Baluchistan	E066 58 53	N30 09	1610
10	ICBW 41232	PAK	Punjab	E072 14	N31 52	150
11	ICBW 85545	AFG	Badakhshan	E70 42	N37 01	2044
12	ICBW 89822	AFG	Bamian	E67.25000	N34.75000	2900
13	ICBW 89823	AFG	Ghowr	E64.86667	N34.25000	3050
14	ICBW 90161	AFG	Farah	E62 07	N32 23	750
15	ICBW 90185	AFG	Balkh	E66 58	N36 48	350
16	ICBW 90186	AFG	Faryab	E064 55	N36 25	300
17	ICBW 90192	AFG	Badghis	E63 35	N34 39	1550
18	ICBW 90221	AFG	Baghlan	E69.15000	N35.60000	1300
19	ICBW 127724	AFG	Ghazni	E 68 25	N 33 33	2265
20	ICBW 138285	AFG	Herat	E062 22 33	N34 25 16	1400
21	ICBW 120694	TKM	Krasnovodsk	E056 16 44	N38 25 55	360
22	ICBW 138363	TKM	Ashgabat	E 58 22	N 37 57	---
23	ICBW 138397	TKM	Mary	E63 05 33	N36 08 05	900
24	ICBW 138427	TKM	Ashkhabad	E 56 20	N 38 42	---
25	ICBW 138429	TKM	Charjew	E 66 17	N 37 35	---
26	ICBW 138599	TKM	Mary	E 60 30	N 37 22	---
27	ICBW 138668	TKM	Tashauz	E 59 57	N 41 50	---
28	ICBW 138690	TKM	Ashkhabad	E 56 16	N 38 25	---
29	ICBW 141181	TKM	Mary	E 62 45	N 36 02	---
30	ICBW 141200	TKM	Mary	E 60 30	N 37 22	---
31	ICBW 138380	AZE	Zangelan	E046 40 48	N39 04	390
32	ICBW 138433	AZE	Naxcivan	E 45 24	N 39 13	1100
33	ICBW 138619	AZE	Shemakha	E048 55	N40 33	970
34	ICBW 138620	AZE	Zakataly	E046 48	N41 30 43	460
35	ICBW 138673	AZE	Dzhebrail	E 47 29	N 39 30 20	---
36	ICBW 138678	AZE	Lankaran	E 48 51	N 38 28	---
37	ICBW 140436	AZE	Salyan	E48 58.445	N39 36.86	---
38	ICBW 140437	AZE	Masalli	E48 37.598	N39 5.196	20
39	ICBW 140887	AZE	Nagorno-Karabakh	46 44 12	39 12 54	386
40	ICBW 141350	AZE	Agdam	E46.561	N40.59	---
41	ICBW 42283	TUR	Hakkari	E044 06	N37 47	1900
42	ICBW 42321	TUR	Agri	E044 05	N39 50	1820
43	ICBW 42447	TUR	Erzurum	E41 20	N40 02	1810
44	ICBW 42498	TUR	Erzincan	E040 24	N39 47	1420
45	ICBW 42741	TUR	Diyarbakir	E040 03 45	N38 22 15	950
46	ICBW 42788	TUR	Adiyaman	E37 50	N37 45	600
47	ICBW 42887	TUR	Amasya	E035 37 46	N40 51 46	400
48	ICBW 43066	TUR	Canakkale	E026 31 16	N39 34 03	310
49	ICBW 43075	TUR	Zonguldak	E031 32 15	N41 16 39	60
50	ICBW 144485	TUR	Adana	E 20 036	N 04 37	330

ادامه جدول ۲- مشخصات اکسیشن‌های گندم نان خارجی مورد استفاده در این پژوهش

ردیف	کد شناسایی	منشأ	استان	طول جغرافیایی (درجه)	عرض جغرافیایی (درجه)	ارتفاع از سطح دریا (متر)
51	ICBW 108723	IRQ	Ninawa	E42 15	N36 22	340
62	ICBW 108740	IRQ	Dahuk	E043 42 32	N36 40 15	500
53	ICBW 108748	IRQ	Babil	E44 21	N32 14	30
54	ICBW 108753	IRQ	As Sulaymaniyah	E45.249	N35.749	---
55	ICBW 108759	IRQ	Al Ta'min	E044 18 22	N35 31 57	210
56	ICBW 108799	IRQ	Dahuk	E043 45 20	N36 37 03	500
57	ICBW 108803	IRQ	As Sulaymaniyah	E45 55	N35 48	1250
58	ICBW 108814	IRQ	Arbil	E44 21	N36 33	700
59	ICBW 141233	IRQ	Al Qadisiyah	E44 55	N31 59	---
60	ICBW 144472	IRQ	Ninawa	E043 06 36	N36 19 48	---
61	ICBW 42070	SYR	Idlib	E36 43 40	N35 46 30	560
62	ICBW 42689	SYR	Homs	E36 55 10	N34 32 20	770
63	ICBW 95833	SYR	Dayr Az Zawr	E40 28	N35 00	270
64	ICBW 98824	SYR	Al Hasakah	E40 23	N36 39	410
65	ICBW 98825	SYR	Al Hasakah	E40 20	N36 39	420
66	ICBW 110707	SYR	Aleppo	E37 30 43	N35 46 51	350
67	ICBW 138789	SYR	Dar'a	E036 06	N32 37 12	---
68	ICBW 140872	SYR	Hama	E036 13 25	N35 37 04	730
69	ICBW 141055	SYR	Dayr Az Zawr	E 33 040	N 34 55	270
70	ICBW 145114	SYR	Ar Raqqah	E38.77395	N35.75101	273

جدول ۳- مشخصات ارقام شاهد بین‌المللی گندم نان مورد استفاده در این پژوهش

نام رقم	شاهد	برای جابجایی
Kavkaz	مثبت	1BL.1RS
Tam 107	مثبت	1AL.1RS
Tam 105	منفی	فاقد 1RS
بهاره چینی	منفی	فاقد 1RS

جدول ۴- مشخصات نشانگر به‌کار رفته در این پژوهش

منبع	توالی جفت نشانگر (۳' → ۵')	نشانگرO-SEC
Shimizu *et al*., (1997)	CTATTAGTTCGAAAAGCTTATGA	آغازگر مستقیم
	GCATATGACTCAAATTATTTTTT	آغازگر معکوس

تشخیص و تفسیر توالی‌ها

باندهای حاصل از محصول PCR رقم مغان ۳ بعد از عمل خالص‌سازی از ژل به روش Glassmilk، جهت توالی‌یابی به شرکت کاوش فناور کوثر ارسال گردید (http://www.ktecompany.ir). پس از دریافت نتیجه تعیین توالی به‌منظور پیدا کردن نزدیک‌ترین توالی‌های موجود در بانک ژن جهانی و هم‌ردیفی بین توالی‌ها، از موتور جستجوی BLASTn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ Blast.cgi) در پایگاه NCBI استفاده شد.

نتایج و بحث

در این مطالعه با استفاده از روش PCR اختصاصی ژن‌های *Lr26*، *Sr31* و *Yr9* در ژنوم‌های A و B گندم نان مورد شناسایی قرار گرفت. نشانگر O-SEC بر اساس ژن‌های امگا سکالین در جایگاه‌ژنی *Sec-1* طراحی شده است. این جایگاه روی ناحیه ماهواره کروموزوم ۱ چاودار (1R) واقع است (Shimizu *et al*., 1997). موفقیت در تکثیر قطعات موردنظر در ژنوم گندم، بیانگر جابجایی گندم-چاودار و احتمالاً وجود ژن‌های *Lr26*، *Sr31* و *Yr9* در اثر جابجاشدن 1RS

با گروه همولوگ شماره ۱ گندم می‌باشد. نحوه شناسایی جابجایی‌های گندم- چاودار 1AL.1RS و 1BL.1RS از روی اندازه باندهای تکثیرشده در PCR و مقایسه با الگوی باندی شاهدهای مورداستفاده می‌باشد. نشانگر O-SEC قادر به تمایز جابجایی 1AL.1RS و 1BL.1RS می‌باشد. این نشانگر در جابجایی 1AL.1RS دو باند ۱۵۳۰ bp و ۱۰۹۵ bp و در جابجایی 1BL.1RS دو باند ۱۵۳۰ bp و ۷۰۰ bp را قادر است، تکثیر کند (جدول ۵). باند ۱۵۳۰ bp در همه ارقام حامل 1RS تکثیر شد که این بیانگر حضور *Sec-1* در همه ارقام حامل جابجایی گندم- چاودار است. از آن جایی‌که *Sec-1* با ژن‌های مقاومت به بیماری‌های زنگ قهوه‌ای (*P. triticina*) مربوط به ژن *Lr26*، زنگ سیاه (*P. graminis*) مربوط به ژن *Sr31*، زنگ زرد (*P. striiformis*) مربوط به ژن *Yr9* کاملاً پیوسته است از آن به‌عنوان ابزاری در جهت تأیید حضور یا عدم حضور ژن‌های فوق استفاده شد. در ارقام ایرانی گندم نان مورد بررسی، دو باند ۱۵۳۰ bp و ۷۰۰ bp علاوه بر رقم شاهد مثبت گندم Kavkaz (حامل جابجایی 1BL.1RS) در ۱۴ رقم (۲۱٪) دز، اترک، رسول، مغان ۳، فلات، مهدوی، شیرودی، Mv_{17}، ویری‌ناک، آرتا، دریا، بک‌کراس روشن زمستانه، استار و رصد نیز تکثیر شد، از طرفی این باند در ارقام گندم بهاره چینی و TAM 105 که به‌عنوان شاهدهای منفی به‌کار گرفته شدند تکثیر نشد بنابراین، ارقام مذکور دارای جابجایی 1BL.1RS هستند. در اکسیشن‌های گندم خارجی نیز وجود جابجایی 1BL.1RS تنها در دو اکسیشن (۳٪) ICBW 140436 و ICBW 140437 با توجه به همان الگوی باندی مورد تأیید قرار گرفت. منشأ این دو اکسیشن از کشور آذربایجان بود (شکل ۱). بنابراین در ارقام مذکور حضور ژن‌های *Lr26*، *Sr31* و *Yr9* در کروموزوم 1B گندم مورد تأیید قرار گرفت. دو باند ۱۵۳۰ bp و ۱۰۹۵ bp (جابجایی 1AL.1RS) تنها در شاهد مثبت این جابجایی (TAM 107) و رقم شعله تکثیر شد. به‌عبارت دیگر، تنها ۱/۵٪ ارقام گندم نان ایرانی حامل جابجایی 1AL.1RS هستند و از طرفی هیچ یک از اکسیشن‌های گندم خارجی حامل این جابجایی نیستند (شکل ۱). این امر نیز بیانگر وجود ژن‌های مقاومت فوق در کروموزوم 1A رقم شعله است.

جدول ۵- اندازه باندها در نشانگر مورد استفاده جهت شناسایی 1AL.1RS و 1BL.1RS

نام نشانگر	اندازه باند (bp)	1AL.1RS	1BL.1RS	دارای 1RS	فاقد 1RS	
		TAM 107	Kavkaz	چاودار	بهاره چینی	TAM105
O-SEC	۱۵۳۰	+	+	+	−	−
	۱۰۹۵	+	−	−	−	−
	۷۰۰	−	+	−	−	−

+ وجود باند/ − عدم‌وجود باند

شکل ۱- شناسایی جابجایی گندم-چاودار 1AL.1RS و 1BL.1RS با نشانگر اختصاصی O-SEC

M- مارکر (bp ۳۰۰۰-۱۰۰)، ۱- چاودار، ۲-Tam 107، ۳- Kavkaz، ۴- بهاره چینی، ۵- Tam 105، ۶- دز، ۷- اترک، ۸- رسول، ۹- مغان ۳، ۱۰- فلات، ۱۱- مهدوی، ۱۲- شعله، ۱۳- شیرودی، ۱۴- Mv17، ۱۵- ویری‌ناک، ۱۶- آرتا، ۱۷- دریا، ۱۸- بک‌کراس روشن زمستانه، ۱۹- استار، ۲۰- رصد، ۲۱- ICBW 140436، ۲۲- ICBW 140437.

در این مطالعه به طور کلی فراوانی جابجایی‌های کروموزومی در گندم‌های ایرانی بیش از اکسیشن‌های خارجی گندم نان مشاهده شد. دلیل آن می‌تواند این باشد که بسیاری از گندم‌های ایرانی تجاری و اصلاح‌شده هستند و در شجره آن‌ها از ارقام حامل ژن‌های مقاومت به زنگ‌ها استفاده شده است. نتایج به دست آمده در این بررسی حضور *Sec-1* را جدا از تمایز نوع جابجایی تأیید کرد به‌طوری‌که باند ۱۵۳۰ bp در همه ارقام حامل 1RS تکثیر شد که این بیانگر حضور *Sec-1* در همه ارقام حامل جابجایی گندم- چاودار است. پس از توالی‌یابی باند ۱۵۳۰ bp مربوط به *Sec-1* حاصل از محصول PCR رقم مغان ۳ نزدیکترین توالی‌های موجود در بانک ژن جهانی با این توالی، توسط موتور جستجوی BLASTn در پایگاه NCBI بدست آمد (جدول ۶). تمام این توالی‌های ثبت‌شده این موضوع را تأیید کردند که نشانگر O-SEC براساس ژن‌های امگا سکالین در جایگاه‌ژنی *Sec-1* طراحی شده است (جدول ۶). نتایج حاصل از جدول ۶ نشان داد که این توالی‌های ثبت‌شده مربوط به چاودار و تلاقی‌های گندم تتراپلوئید با چاودار (*T. turgidum subsp. durum* × *S. cereale*)، و گندم هگزاپلوئید با چاودار (*T. aestivum* × *S. cereale*) است. علاوه بر این حداکثر تطابق ۹۶٪ مشاهده شد و نکته مثبت دیگر در نتایج به‌دست‌آمده این بود که مقدار ارزش موردانتظار توالی‌های به‌دست‌آمده صفر بود (جدول ۶) که بیانگر اعتبار بالای حداکثر امتیاز گزارش شده است. بنابراین حضور *Sec-1* در ارقام حامل جابجایی با این نشانگر تأیید شد. هم‌ردیفی توالی باند حاصل از محصول PCR رقم مغان ۳ با اکسیشن شماره FJ949579.1 چاودار (*S. cereale* isolate ROGO26 *omega secalin*) نیز صورت پذیرفت. میزان پوشش‌دهی در این هم‌ردیفی ۱۰۰٪ مشاهده شد و از سوی دیگر مقدار ارزش موردانتظار هم‌ردیفی صفر بود که بیانگر معنی‌دار بودن هم‌ردیفی دو توالی است (جدول ۶).

به‌علت وجود ژن‌های مقاومت به بیماری از جمله ژن‌های

جدول ۶- توالی‌های ثبت‌شده مربوط به جایگاه‌ژنی *Sec-1*، در بانک‌های اطلاعاتی با بالاترین تشابه با توالی رقم گندم نان مغان ۳

شماره اکسیشن	شرح	حداکثر امتیاز	امتیاز کلی	پوشش دهی	E value	حداکثر تطابق
FJ949579.1	*S. cereale* isolate ROGO26 omega secalin (*Sec-1*) pseudogene, complete sequence	1587	1933	100%	0.0	96%
FJ949606.1	*S. cereale* isolate ROGO36 omega secalin (*Sec-1*) pseudogene, complete sequence	1576	1917	100%	0.0	96%
FJ561455.1	*S. cereale* isolate ROGO-31 omega secalin pseudogene, complete sequence	1548	1909	100%	0.0	95%
FJ949583.1	*S. cereale* isolate ROGO70 omega secalin (*Sec-1*) pseudogene, complete sequence	1531	1893	100%	0.0	95%
FJ561454.1	*S. cereale* isolate ROGO-1 omega secalin pseudogene, complete sequence	1528	1889	100%	0.0	95%
FJ949580.1	*S. cereale* isolate ROGO27 omega secalin (*Sec-1*) pseudogene, complete sequence	1498	1837	100%	0.0	94%
FJ561468.1	*T. aestivum* × *S. cereale* isolate H935305-31 omega secalin pseudogene, complete sequence	1493	1865	100%	0.0	94%
FJ561471.1	*T. aestivum* × *S. cereale* isolate H935305-47 omega secalin pseudogene, complete sequence	1476	1848	100%	0.0	94%
FJ949599.1	*T. aestivum* × *S. cereale* isolate 8Tri158 omega secalin (*Sec-1*) pseudogene, complete sequence	1471	1835	100%	0.0	94%
FJ949593.1	*T. aestivum* × *S. cereale* isolate 8Tri141 omega secalin (*Sec-1*) pseudogene, complete sequence	1471	1843	100%	0.0	94%
FJ561472.1	*T. aestivum* × *S. cereale* isolate H935305-48 omega secalin pseudogene, complete sequence	1471	1823	100%	0.0	94%
FJ561460.1	*T. turgidum* subsp. *durum* × *S. cereale* isolate Ultima-118 omega secalin gene, complete cds	1459	1832	100%	0.0	93%

مقاومت به زنگ (*Lr26*، *Sr31* و *Yr9*) از 1RS به‌طور وسیعی در برنامه‌های اصلاحی گندم استفاده می‌شوند. بنابراین، شناسایی این ژن‌ها به منظور بهره‌برداری از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی از اهمیت بالایی برخوردار است (Rabinovich *et al*., 1998; Yediay *et al*., 2010). از پیوستگی نزدیک پروتئین *Sec-1* با ژن‌های مقاومت *Lr26*، *Sr31* و *Yr9* نیز برای شناسایی ژن‌های فوق استفاده شده است. در مطالعه‌ای با روش SDS-PAGE حضور پروتئین *Sec-1* در ۸ رقم تجاری مهم گندم نان مقاوم به زنگ مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید دو رقم مهدوی و اترک داری پروتئین *Sec-1* می‌باشند و ۶ رقم باقی‌مانده یعنی الوند، داراب ۲، تجن، نیک‌نژاد، زرین و الموت فاقد این پروتئین گزارش شدند (Afshari, 2006). در مطالعه‌ای دیگر با همین تکنیک، ۲۹ رقم گندم نان ایرانی و ۱۵ رقم گندم دوروم مورد ارزیابی قرار گرفتند که ۵ رقم گندم نان دز، اترک، فلات، رسول و مغان ۳ حاوی پروتئین *Sec-1* تشخیص داده شدند (Tabibzadeh *et al*., 2013) که نتایج تحقیق حاضر با روش PCR اختصاصی با این گزارش‌های مطابقت دارد. با بررسی مطالعات پیشین در کشور می‌توان گفت، این ژن‌های مقاومت به زنگ‌ها در ژنوم B (جابجایی 1BL.1RS) در ۷ رقم شیرودی، ویری‌ناک، آرتا، دریا، بک‌کراس روشن زمستانه، استار و رصد برای اولین بار است که گزارش می‌شوند. شعله نیز اولین گزارش در مورد حضور ژن‌های فوق در ژنوم A (جابجایی 1AL.1RS) در گندم نان ایرانی است. علی‌رغم استفاده گسترده از ژن‌های مقاومت به زنگ در گندم به‌علت حضور بازوی 1RS در برنامه‌های اصلاحی جهان، از جمله آمریکا، چین، مکزیک و بسیاری از کشورهای اروپایی (Rabinovich, 1998) به‌نظر می‌رسد هنوز در برنامه‌های اصلاحی ایران به‌طور جدی مورد توجه قرار نگرفته است. نظر به اینکه گزینش با کمک نشانگر روشی سریع و مطمئن برای شناسایی ژن‌های مقاومت در برنامه‌های اصلاحی گندم است، از ارقام و اکسیشن‌های معرفی‌شده در این تحقیق می‌توان در برنامه‌های اصلاحی کشور به‌منظور ایجاد ارقام جدید استفاده کرد.

سپاسگزاری

از دانشگاه تربیت مدرس به خاطر حمایت مالی از این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

Afshari F (2006) Protein marker assisted identification of *Yr9*, *Lr26* and *Sr31*genes in a group of Iranian wheat cultivars. J. Agric. Sci. Technol. 8: 265-268.

Berzonsky WA, Francki MG (1999) Biochemical, molecular, and cytogenetic technologies for characterizing 1RS in wheat. Euphytica. 108: 1-19.

Doyle J, Doyle J (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11-15.

Friebe B, Jiang J, Raupp W, McIntosh R., Gill B (1996) Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: Current Status. Euphytica. 91: 59-87.

Landjeva S, Korzun V, Tsanev V, Vladova R, Ganeva G (2006) Distribution of the wheat-rye translocation 1RS.1BL among bread wheat varieties of Bulgaria. Plant Breed. 125: 102-104.

Rabinovich S (1998) Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivar of *Triticum aestivum* L. Euphytica. 100: 323-340.

Schlegel, R, Melz G, Korzun, V (1998) Genes, marker and linkage data of rye (*Secale cereale* L.): 5th updated inventory. Euphytica. 101: 23-67.

Shimizu Y, Nasuda S, Endo TR (1997) Detection of the *Sec-1* locus of rye by a PCR-based method. Genes. Genet. Syst. 72: 197-203.

Tabibzadeh N, Karimzadeh G, Naghavi MR (2013) Distribution of 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat-rye translocations in Iranian wheat, using PCR based markers and SDS PAGE. Cereal Res. Commun. 41(3): 1-10.

Weng Y, Azhaguvel P, Devkota R, Rudd J (2007) PCR-based markers for detection of different sources of 1AL.1RS and

1BL.1RS wheat-rye translocations in wheat background. Plant Breed. 126: 482-486.

Yediay FE, Baloch FS, Kilian B, Özkan H (2010) Testing of rye-specific markers located on 1RS chromosome and distribution of 1AL.RS and 1BL.RS translocations in Turkish wheat (*Triticum aestivum* L., *T. durum* Desf.) varieties and landraces. Genet. Resour. Crop Evol. 57: 119-129.