مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد هفدهم، شماره سوم، ۱۳۸۹
www.gau.ac.ir/journals

ردیابی ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای $Lr_{۳۲}$ در ارقام و لاین‌های گندم ایرانی با استفاده از آزمون تیپ آلودگی و نشانگرهای مولکولی پیوسته به ژن $Lr_{۳۲}$

آیت‌اله شفیعی[۱]، بهرام ملکی‌زنجانی[۲]، *ثریا کرمی[۳] و فرحناز ایمانی‌خواه[۱]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه زنجان، [۲]استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه زنجان، [۳]عضو هیأت علمی گروه زراعت، دانشگاه پیام‌نور خوزستان

تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۱۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۸

چکیده

بیماری زنگ قهوه‌ای (زنگ برگی) گندم، یکی از بیماری‌های بسیار مهم در کشور ایران می‌باشد که تقریباً در تمام مناطق گندم‌خیز ظاهر می‌شود و عملکرد و کیفیت گندم را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. مهم‌ترین استراتژی مقابله با این بیماری استفاده از مقاومت ژنتیکی است و تاکنون ۵۱ ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای در گندم گزارش شده است. این پژوهش به‌منظور شناسایی حضور و یا حضور نداشتن ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای $Lr_{۳۲}$ در ٤٨ رقم و لاین گندم ایرانی با استفاده از آزمون مورفولوژیکی و نشانگرهای مولکولی پیوسته به ژن $Lr_{۳۲}$ انجام گردید. آنالیز تیپ آلودگی براساس دستورالعمل بین‌المللی برودر (۱۹۷۳) با استفاده از ٦ جدایه زنگ قهوه‌ای شناسایی شده در ایران انجام شد که ۱۷ رقم از ٤٨ رقم مورد مطالعه، نسبت به جدایه‌های بیماری‌زا بر روی ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای $Lr_{۳۲}$ از خود تیپ آلودگی پایین‌تری نشان دادند. مقاومت موجود در این ارقام و لاین‌ها ناشی از حضور ژن یا ژن‌هایی، غیر از ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای $Lr_{۳۲}$ می‌باشد، در ضمن احتمال حضور ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای $Lr_{۳۲}$ یا ژن‌هایی با اثر مشابه در ۲۵ رقم و لاین مورد آزمایش پیش‌بینی گردید و در ٦ رقم احتمال حضور ژن $Lr_{۳۲}$ منتفی گردید. در بخش مولکولی با استفاده از نشانگرهای مولکولی رپید

* مسئول مکاتبه: karamisoraya@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

($S_{٤٩}$ و $S_{٤٢١}$) وجود نوارهای ۱۱۰۰ جفت باز و ٦٤٠ جفت باز که در مطالعات قبلی همبستگی زیادی با ژن $Lr_{٣٢}$ در گندم نشان داده اند در ٤٨ رقم گندم مورد مطالعه قرار گرفت. طبق انتظار نوارهای ۱۱۰۰ و ٦٤٠ جفت باز در رقم شاهد مثبت (لاین ایزوژن حاوی ژن $Lr_{٣٢}$) مشاهده گردید ولی در هیچ‌یک از نمونه‌های مورد مطالعه و شاهدان منفی (رقم بولانی و آگرالوکال) تکثیری مشاهده نشد. نتایج داده‌های مولکولی در توافق با آزمون تیپ آلودگی بیانگر این حقیقت است که در این پژوهش، ارقام و لاین‌های گندم مورد مطالعه، فاقد ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای $Lr_{٣٢}$ می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: زنگ قهوه‌ای، گندم، ژن $Lr_{٣٢}$، تیپ آلودگی، نشانگرهای مولکولی

مقدمه

گندم نانوایی (*Triticum aestivum*) از خانواده پوآسه[1] از مهم‌ترین گیاهان زراعی مناطق معتدل ایران و جهان به‌شمار می‌رود که بیش از ۳۰ درصد اراضی زیر کشت را به خود اختصاص داده است (کریمی، ۱۹۹۳). با توجه به وسعت سطح زیر کشت گندم و قدمت زراعت آن، این گیاه در طول دوره رشد مورد حمله بسیاری از عوامل بیماری‌زا از جمله زنگ‌ها قرار گرفته است. زنگ‌های گندم در بیشتر کشورهای جهان جزء مهم‌ترین بیماری‌های گندم محسوب می‌شود و هر جایی‌که گندم کشت می‌شود، زنگ‌های گندم نیز وجود دارند (نات، ۱۹۸۹). زنگ‌های شناخته شده گندم شامل زنگ قهوه‌ای[2] با عامل *Puccinia triticina Syn. recondita Rob Ex Desm f. sp. Tritici Eriks. & Henn*، زنگ سیاه با عامل *P. graminis f. sp. tritici* و زنگ زرد با عامل *P. striiformis f. sp. tritici* می‌باشند که در بیش‌تر مناطق کشت و کار گندم‌خیز دنیا شایع می‌باشند. از زنگ‌های سه‌گانه گندم، زنگ قهوه‌ای انتشار بیش‌تری دارد (رولف و همکاران، ۱۹۹۲؛ نات، ۱۹۸۹). این بیماری، در ایران، ابتدا در سال ۱۹٤۸ گزارش شده است (اسفندیاری، ۱۹٤۸). در حال حاضر اهمیت اقتصادی زنگ قهوه‌ای در ایران، بیش‌تر از زنگ سیاه و کم‌تر از زنگ زرد است ولی گستردگی آن از زنگ زرد بیش‌تر است (بامدادیان، ۱۹۹۳). این بیماری در تمام مناطق ایران به‌خصوص نواحی غرب، شمال‌غرب، خوزستان و قسمت‌هایی از خراسان و گرگان مشاهده و گزارش شده است (بامدادیان، ۱۹۹۳). قارچ عامل زنگ قهوه‌ای به شرایط محیطی،

1- *Poaceae*
2- Leaf Rust

Archive of SID

www.SID.ir

به‌خصوص دما حساس است. دمای لازم برای گسترش وسیع این بیماری در حدود ۲۲-۲۰ درجه سلسیوس می‌باشد، که این متوسط دما در بیش‌تر مناطق ایران در اواخر دوره رشد گندم مهیا می‌شود (معینی، ۱۹۹۸)، این امر باعث می‌شود که زنگ قهوه‌ای گسترش وسیعی در ایران داشته باشد (معینی، ۱۹۹۸؛ معینی و بامدادیان، ۱۹۹٤). اگر کوچک‌ترین تغییری در شرایط آب و هوای مناطق مستعد ایجاد شود این بیماری به‌صورت بسیار شدیدی گسترش یافته و باعث خسارات جبران‌ناپذیر خواهد شد. با توجه به اهمیت زنگ قهوه‌ای در ایران و سایر نقاط دنیا مبارزه لازم است که با این بیماری مبارزه کرد. از میان روش‌های مبارزه با زنگ‌ها می‌توان به استفاده از ارقام مقاوم اشاره کرد. مقاوم کردن ژنتیکی گیاهان مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین روش مبارزه با زنگ‌ها می‌باشد. مقاوم کردن ارقام زراعی مزایای زیادی نسبت به به‌کارگیری مواد شیمیایی و سایر روش‌های مبارزه دارد. زیرا هزینه سموم، نیروی کار و زمان کاهش پیدا می‌کند. مقاومت ژنتیکی ناشی از حضور ژن‌های مقاوم علیه بیماری‌ها در ارقام زراعی می‌باشد. با توجه به این‌که اهمیت زنگ قهوه‌ای در سال‌های اخیر بیش از گذشته شده است و در بعضی از مناطق گندم‌خیز ایران از جمله استان‌های خوزستان، اردبیل، آذربایجان و استان‌های شمال‌غربی اهمیت زنگ قهوه‌ای بیش از زنگ‌های دیگر است (بامدادیان، ۱۹۹۳)، استفاده از ارقام تجاری حامل ژن‌های مقاوم به زنگ قهوه‌ای به‌عنوان کارآمدترین، اقتصادی‌ترین و از لحاظ زیست‌محیطی سالم‌ترین روش مبارزه با بیماری زنگ قهوه‌ای می‌باشد (مک‌اینتاش و همکاران، ۱۹۹۵). تاکنون ۵۱ ژن و چند واریانت مختلف از ژن‌ها که مقاومت به زنگ قهوه‌ای (Lr) را ایجاد می‌کنند شناسایی و معرفی شده‌اند که از بین آن‌ها می‌توان به $Lr_{۲۸}$، $Lr_{۹}$، $Lr_{۱۹}$، $Lr_{۲٤}$ و $Lr_{۳۲}$ به‌عنوان مهم‌ترین ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای اشاره کرد (چلکووسکی و همکاران، ۲۰۰۱؛ چلکووسکی و همکاران، ۲۰۰۳). روش‌های مختلفی به‌منظور بررسی ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای و تعیین ژنوتیپ‌های مقاومت در ارقام گندم از طریق داده‌های تیپ آلودگی برودر (۱۹۷۳) و بررسی صحت نتایج به‌دست آمده به‌وسیله روش ژنتیکی (لوجرینگ و برودر، ۱۹۷۱؛ استتلر، ۱۹۸٤) معرفی گردید. مطالعات صورت گرفته، کارآیی تجزیه و تحلیل داده‌های تیپ آلودگی به‌عنوان یک ابزار با ارزش در مطالعه تغییرات ژنتیکی میزبان و پاتوژن و شناسایی فنوتیپ نا شناخته از طریق الگوی تیپ آلودگی تعدادی لاین تقریباً ایزوژن و ارقام با ژنوتیپ ناشناخته را تأیید نمودند (ریزوی و استاتلر، ۱۹۸۲؛ موداوی و همکاران، ۱۹۸۵؛ سینگ و همکاران، ۲۰۰٤). در مطالعه به‌منظور بررسی وجود ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای سه پاتوتایپ نژاد ۷۷ زنگ قهوه‌ای بر روی ۳۷ رقم گندم و ۲۰ لاین ایزوژن مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج نشان دادند که بعضی از ارقام دارای ژن

Archive of SID

www.SID.ir

مقاومت در مرحله گیاه کامل و بعضی دارای ژن‌های مقاومت در مرحله گیاهچه‌ای می‌باشند (شیوانی و ساینی، ۱۹۹۳). علاوه‌بر آزمون‌های تیپ آلودگی، تکنیک گزینش به کمک نشانگر[1] نیز نقش بسیار مهمی در شناسایی ژن‌های مقاومت ایفا کنند و مطالعات وسیعی در این زمینه انجام گردیده است (گوپتا و همکاران، ۲۰۰۵؛ چرکوری و همکاران، ۲۰۰۳). در تکنیک گزینش به کمک نشانگر[2] همبستگی بین نشانگرهای DNA و صفات مهم زراعی هم‌چون مقاومت به عوامل بیماری‌زا، حشرات، نماتدها، تحمل به تنش‌های غیرزنده، پارامترهای کیفیت و صفات کمی مورد بررسی قرار می‌گیرد؛ در این روش نشانگرهایی که در مجاورت ژن هدف قرار دارند، شناسایی و انتخاب می‌شوند، به این ترتیب این روش به شناسایی گیاهان حامل ژن‌های هدف به‌طور هم‌زمان و بدون قرار دادن در معرض هجوم پاتوژن یا حشره در نسل‌های اولیه، کمک خواهد کرد (ارزانی و همکاران، ۲۰۰۶).

استراتژی شناسایی ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای با طراحی نشانگرهای رپید (چندشکل تکثیریافته تصادفی)[3] (اتریگو و همکاران، ۱۹۹۵) و RFLP (چندشکلی طولی قطعات برش‌یافته)[4] (پرینس و همکاران، ۲۰۰۱) برای ژن‌های Lr_{1}، Lr_{9}، Lr_{10}، Lr_{13}، Lr_{19}، Lr_{24}، Lr_{25}، Lr_{27}، Lr_{29}، Lr_{31}، Lr_{33}، Lr_{34}، Lr_{35}، Lr_{37} و Lr_{42} و SSR (توالی‌های کوتاه تکرارشونده)[5] (مک‌کارتنی و همکاران، ۲۰۰۴) آغاز گردید که در مراحل بعدی نشانگرهای رپید به‌دلیل تکرارپذیری پایین و حساس بودن به تغییرات شرایط واکنش (نقوی و همکاران، ۲۰۰۶) و RFLP به نشانگرهای کپس (توالی‌های چندشکل مبتنی بر تکثیر و برش)[6]، اسکار (نواحی تکثیریافته توالی‌های خاص)[7] (پرابهو و همکاران، ۲۰۰۴) و STS (نقاط نشانمند از توالی)[8] (چلکوسکی و همکاران، ۲۰۰۳) تبدیل و برای شناسای ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. اولین نشانگرهای STS پیوسته به ژن Lr_{9} از بین ۳۹۵ نشانگر رپید با اجرای تلاقی بین رقم ایزوژن حاوی ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای Lr_{9} و رقم حساس"ارینا" (ساچرمیر و همکاران، ۱۹۹۴) و پیوسته به ژن Lr_{28} (نایک و همکاران، ۱۹۹۸) و یک نشانگر RFLP با مشخصات PSR۵۴۶ به فاصله ۸/۲ سانتی‌مورگان با ژن Lr_{9} گزارش گردید

1- Marker Assist Selection (MAS)
2- Marker Assist Selection (MAS)
3- Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)
4- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)
5- Short Sequence Repeat (SSR)
6- Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS)
7- Sequence Characterized Amplified Region (SCAR)
8- Sequence Tagged Sites (STS)

Archive of SID

www.SID.ir

(ساچرمیر و همکاران، ۱۹۹٤). در طی برنامه نشانمند کردن ژن مقاوم به زنگ قهوه‌ای $Lr_{۲۸}$، نشانگر SSR، $Xgwm_{۱٦۰}$ معرفی گردید که در ارقام فاقد ژن $Lr_{۲۸}$ باند ۱۹٦ جفت بازی و در ارقام دارای ژن $Lr_{۲۸}$ در ناحیه موردنظر باندی آشکار نشد (ویکال و همکاران، ۲۰۰٤). با توجه به گستردگی زنگ قهوه‌ای در کشور و خسارات ایجاد شده، هدف از این پژوهش: ۱) استفاده هم‌زمان از آزمون‌های تیپ آلودگی و نشانگرهای مولکولی پیوسته به ژن $Lr_{۳۲}$ به‌منظور بررسی وجود یا نبود ژن مقاوم به زنگ قهوه‌ای $Lr_{۳۲}$ در بین مهم‌ترین لاین‌ها و ارقام تجاری گندم موجود در سطح کشور، ۲) ارزیابی کارآیی نشانگرهای مولکولی پیوسته به ژن $Lr_{۳۲}$ معرفی شده در مهم‌ترین ارقام گندم مورد کشت در ایران و ۳) تهیه شناسنامه ژنتیکی ارقام مورد بررسی از نظر حضور و یا حضور نداشتن ژن‌های مقاوم به زنگ قهوه‌ای $Lr_{۳۲}$ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این پژوهش از ٤۸ لاین و رقم تجاری گندم و سه رقم استاندارد (دو رقم شاهد حساس و رقم تاچر حاوی ژن مقاوم به زنگ قهوه‌ای $Lr_{۳۲}$) استفاده شد. همه ارقام از مرکز تحقیقات خیرآباد استان زنجان و لاین‌ها و ارقام استاندارد از بانک ژن مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید. در جدول ۱، نام لاین‌ها و ارقام همراه با کد شناسایی آن‌ها آمده است.

مراحل پژوهش‌های گلخانه‌ای: اولین مرحله پژوهش گلخانه‌ای کاشت بذر رقم حساس بولانی، به‌منظور تکثیر اسپور جدایه‌های بیماری‌زا بوده است. در این پژوهش از اسپور شش جدایه قارچ زنگ قهوه‌ای موجود در ایران که توانایی بیماری‌زایی آن‌ها توسط مراکز تحقیقاتی ذکر شده در جدول ۲، تأیید گردید، استفاده شد (گزارش منتشر نشده)[۱]. بعد از ۷ الی ۹ روز که گیاهچه‌های گندم به ابتدای مرحله دو برگی رسیدند، عملیات مایه‌زنی بر روی رقم حساس بولانی بروش پودر تالک (۱ قسمت اسپور، ٤ قسمت پودر تالک) انجام گردید. مرحله دوم به‌منظور شناسایی جدایه‌های مناسب از نظر بیماری‌زایی و غیربیماری‌زایی جهت تعیین ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای $Lr_{۳۲}$ صورت گرفت. در این مرحله همه جدایه‌ها در چهار تکرار بر روی نمونه استاندارد کشت شده در محیط گلخانه زنگ، بروش پودر تالک مایه‌زنی گردید؛ همچنین رقم حساس بولانی به‌عنوان شاهد منفی کشت شد. سومین مرحله مایه‌زنی نمونه‌های اصلی (ارقام و لاین‌ها) در دو تکرار با استفاده از جدایه‌های انتخابی مرحله قبل انجام گردید.

۱- گزارش منتشر نشده بیماری‌های غلات سال زراعی ۷٦-۷۵، بخش تحقیقات غلات، مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، ص۲۹۵

Archive of SID

www.SID.ir

یاداشت‌برداری و نمره‌دهی حدود ۱۲-۱۰ روز بعد از مایه‌زنی بروش رولف و همکاران (۱۹۹۲) انجام پذیرفت. به این ترتیب به هر یک از ارقام استاندارد یا ارقام شاهد مثبت و ارقام تجاری با توجه به تیپ آلودگی که روی آن‌ها ظاهر شده بود درجه‌هایی از ۰ تا ٤ داده شد. درجه‌های ۰، ۱ و ۲ نشان‌دهنده مقاومت و درجه‌های ۳ و ٤ نشان‌دهنده حساسیت در برابر بیماری در نظر گرفته شد. پس از یادداشت‌برداری به هر یک از ارقام و لاین‌ها مطابق دستورالعمل درجه‌های ۰ تا ۲+ به‌عنوان واکنش پایین (L) و درجه‌های ۳ تا ٤ به‌عنوان واکنش بالا (H) در نظر گرفته شد (جدول ۳). در برخی موارد برای اطمینان از نتایج، مایه‌زنی تا ۳ بار نیز تکرار گردید. برای تفسیر نتایج و تعیین ژن‌های مقاومت از روش برودر (۱۹۷۳) استفاده گردید. ترکیبات به‌دست آمده از واکنش لاین ایزوژن- ارقام گیاهی نسبت به جدایه‌های بیماری‌زا و تفسیر ترکیبات به‌دست آمده براساس روش برودر (۱۹۷۳) در جدول ٤، آمده است. همه آزمایش‌های مورفولوژیکی در گلخانه پاتولوژی غلات مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج انجام پذیرفت.

مراحل آزمایش‌های مولکولی: DNA ژنومی همه نمونه‌ها براساس دستورالعمل پرابهو و همکاران (۲۰۰۳) استخراج گردید. در ادامه برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی از روش اسپکتروفتومترلای و بارگذاری بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد. DNA نمونه‌ها به نسبت ۲ درصد رقیق گردید سپس توسط دستگاه اسپکتوفتومترلای غلظت DNA در طول موج‌های ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر محاسبه شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: برای ارزیابی حضور یا حضور نداشتن ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای $Lr_{۳۲}$ از ۲ نشانگر رپید ('۳- CTCTGGAGAC -'۵) $S_{٤۹}$ و ('۳- CTCACGTTGG -'۵) $S_{٤۲۱}$ که توسط پرابهو و همکاران (۲۰۰۳) در طی برنامه نشانمند کردن ژن $Lr_{۳۲}$ بر روی کروموزوم ۲D (سرس، ۱۹۷۳) معرفی گردیده بود، استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۵ نانوگرم از DNA الگو، ۵۰ نانوگرم آغازگر (ساخت شرکت سیناژن)، ۲۰۰ میکرومولار از هر dNTP، ۱۰ میلی‌مولار بافر Tris-HCl (pH ۸/۳)، ۵۰ میلی‌مولار KCl، ۲ میلی‌مولار $MgCl_۲$ و ۰/۷ واحد آنزیم تگ DNA پلی‌مراز[1] (ساخت شرکت سیناژن) بر روی دستگاه ترموسیکلر (ساخت شرکت کوربیت ریسرچ)[2] به‌شرح زیر صورت گرفت: ٤ دقیقه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشت‌سازی اولیه و به‌دنبال آن ٤٤ سیکل هرکدام شامل ۳۰ ثانیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ٤۰-۳۵ درجه سانتی‌گراد و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد با ٤ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت بسط نهایی

1- *Taq* DNA Polymerase
2- Corbett Research

Archive of SID

www.SID.ir

انجام پذیرفت. محصولات تکثیریافته بعد از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد دارای اتیدیوم بروماید با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر در بافر تریس بوریک اسید[1] X ۰/۵ و ولتاژ ۱۰۰ به‌مدت ۱/۵ ساعت بارگذاری شد. سپس ژل تحت نور ماوراءبنفش توسط دستگاه ژل داکیومنت عکس‌برداری شد. همه واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز بعد از بهینه شدن شرایط واکنش و تکثیر بیش از سه بار تکرار شد تا از پایداری باندهای تکثیر شده اطمینان حاصل گردد.

تجزیه و تحلیل نتایج مولکولی: برای تجزیه و تحلیل باندهای به‌دست آمده از نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن $Lr_{۳۲}$ از لاین‌های ایزوژن دارای ژن مقاومت با پایه تاچر به‌عنوان شاهد مثبت و دو رقم بولانی و آگرالوکال به‌عنوان شاهدان منفی استفاده شد. برای ارزیابی اندازه مولکولی محصولات تکثیریافته از نشانگر اندازه bp ۱۰۰ (ساخت شرکت فرمنتاز)[2] و نرم‌افزار آماری ONE-Dscan استفاده شد.

جدول ۱- فهرست لاین‌ها، ارقام تجاری و استاندارد مورد استفاده در پژوهش.

نام	کد	نام	کد	نام	کد
پرستو	۳۵	گ زنجان ۱۵	۱۸	C-۷۳-۵	۱
الموت	۳۶	گ زنجان ۱۷	۱۹	C-۸۳-۶	۲
هیرمند	۳۷	گ زنجان ۲۰	۲۰	C-۸۳-۹	۳
چمران	۳۸	گ زنجان ۲۱	۲۱	C-۸۳-۱۰	٤
دز	۳۹	مهدوی	۲۲	C-۸۰-۱٦	۵
تجن	٤۰	آذر ۲	۲۳	C-۸۳-۱۹	٦
الوند	٤۱	مارون	۲٤	گ زنجان ۳	۷
شهریار	٤۲	عدل	۲۵	گ زنجان ٤	۸
زرین	٤۳	سبلان	۲٦	گ زنجان ۵	۹
پیشتاز	٤٤	بیات	۲۷	گ زنجان ٦	۱۰
توس	٤۵	قدس	۲۸	گ زنجان ۷	۱۱
سرداری	٤٦	شعله	۲۹	گ زنجان ۸	۱۲
مرودشت	٤۷	امید	۳۰	گ زنجان ۹	۱۳
استارکر.کبلر-۷۲	٤۸	روشن	۳۱	گ زنجان ۱۰	۱٤
بولانی	٤۹	گلستان	۳۲	گ زنجان ۱۱	۱۵
آگرالوکال	۵۰	اروند	۳۳	گ زنجان ۱۲	۱٦
رقم تاچر حاوی ژن مقاوم $Lr_{۳۲}$	۵۱	نیک نژاد	۳٤	گ زنجان ۱۳	۱۷

کد ٤۹ و ۵۰: ارقام استاندارد به‌عنوان شاهد منفی، حساس به زنگ قهوه‌ای، کد ۵۱: لاین ایزوژن دارای ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای.

1- Teris Boric Acid
2- MBI Fermentas

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- فهرست جدایه‌های زنگ قهوه‌ای شناخته شده در ایران (گزارش منتشر نشده بیماری‌های غلات سال زراعی ۷۶-۷۵، بخش تحقیقات غلات، مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، ص ۲۹۵).

نام جدایه	نوع واکنش بر روی ژن $Lr_{۲۲}$	مراکز تحقیقاتی	تاریخ جمع‌آوری
۸۳-۸	+	باغ‌کلا- ساری	۸۳/۱/۲۵
۸۳-۹	+	عراقی‌محله- گرگان	۸۳/۱/۲۵
۸۵-۱	+	شاوور- اهواز	۸٤/۱۲/۲۲
۸۵-۱۵	-	چناران- خراسان	۸۵/۲/۳۱
۸٤-۱٦	-	ایستگاه داراب	۸٤/۳/۱
۸٤ -۱۲	-	قراخیل- ساری	۸٤/۲/۱۱

جدول ۳- گروه‌های اصلی تیپ آلودگی زنگ قهوه‌ای گندم براساس روش رولف و همکاران (۱۹۹۲).

تیپ آلودگی*	واکنش میزبان	علایم
۰	مصون	هیچ جوشی دیده نمی‌شود
؛	تقریباً مصون	جوشی وجود ندارد ولی لکه‌های کلروتیک یا نکروتیک فوق حساسیت وجود دارد
۱	خیلی‌مقاوم	جوش‌های کوچک که به‌وسیله نکروز احاطه شده‌اند
۲	مقاوم	جوش‌های کوچک تا متوسط که اغلب به‌وسیله کلروز یا نکروز احاطه شده‌اند. آب سوختگی سبز ممکن است به‌وسیله حاشیه کلروز احاطه شده باشد.
۳	حساس	جوش‌های با اندازه متوسط که ممکن است همراه با کلروز باشند
٤	خیلی حساس	جوش‌های بزرگ بدون کلروز
x	نامتجانس	نامتجانس، جوش‌های متفاوت به‌طور یکسان در سطح وسیعی پراکنده‌اند

* تغییرات تیپ‌های آلودگی به‌وسیله علایم زیر نشان داده می‌شود:

-: بعضی از جوش‌ها کوچک‌تر از حد معمول تیپ آلودگی هستند. --: اندازه جوش‌ها پایین‌تر از تیپ آلودگی است. +: بعضی از جوش‌ها بزرگ‌تر از تیپ آلودگی هستند. ++: اندازه جوش‌ها بالاتر از تیپ آلودگی است. ؛: لکه‌های فوق حساسیت (خیلی مقاوم). C: کلروز بیش‌تر از مقدار معمول است. N: نکروز بیش‌تر از مقدار معمول است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ٤- ترکیبات به‌دست آمده از واکنش لاین‌های ایزوژن- ارقام نسبت به جدایه‌های بیماری‌زا براساس روش برودر (۱۹۷۳).

تفسیر	نوع واکنش	انواع ترکیبات
نشان‌دهنده وجود ژن(های) مشابه یا ژن‌هایی با اثر مشابه در نمونه‌های موجود در مقایسه با ژن موردنظر	لاین دارای ژن $Lr_{۳۲}$ و نمونه موردنظر تیپ مقاومت نشان می‌دهد	L:L
نمونه‌های موجود در این ترکیب فاقد ژن موردنظر می‌باشند یا نبود ژنی مشابه با ژن موردنظر	لاین دارای ژن $Lr_{۳۲}$ تیپ مقاومت و نمونه موردنظر تیپ حساسیت نشان می‌دهد	L:H
نمونه‌های موجود در این ترکیب دارای ژن‌هایی با تیپ آلودگی پایین‌تر از ژن موردنظر می‌باشند	لاین دارای ژن $Lr_{۳۲}$ تیپ حساسیت و نمونه موردنظر تیپ مقاومت نشان می‌دهد	H:L
نشان‌دهنده وجود ژن(های) مشابه یا ژن‌هایی با اثر مشابه در نمونه‌های موجود در مقایسه با ژن موردنظر	لاین دارای ژن $Lr_{۳۲}$ و نمونه موردنظر تیپ حساسیت نشان می‌دهد	H:H

نتایج و بحث

آزمون تیپ آلودگی: استفاده از آزمون تیپ آلودگی برای تعیین وجود ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای از جمله روش‌های پایه‌ای و قدیمی به‌شمار می‌رود. در این آزمون، ابتدا جدول واکنش لاین‌های ایزوژن نسبت به جدایه‌های شناخته شده بیماری موردنظر تشکیل داده می‌شود و دو گروه جدایه از پاتوژن‌ها انتخاب می‌شوند. گروه اول جدایه‌هایی که نسبت به ژن Lr موردنظر تیپ آلودگی پایین نشان می‌دهند، به‌عبارت دیگر جدایه‌های که تیپ آلودگی صفر، ۱ و ۲ نسبت به ژن Lr تولید کرده باشد برای واکنش پایین انتخاب می‌شوند و گروه دوم جدایه‌هایی که نسبت به ژن Lr تیپ آلودگی بالا نشان دهند، یعنی تیپ‌های آلودگی ۳ یا ٤، برای واکنش بالا انتخاب می‌شوند. در مرحله بعدی جدایه‌های انتخاب شده بر روی ارقام مختلف گندم آزمایش شده و نتایج آن یادداشت‌برداری و آنالیز می‌گردد. از بین مهم‌ترین ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای- $Lr_{۹}$، $Lr_{۱۹}$، $Lr_{۲٤}$، $Lr_{۲۸}$ و $Lr_{۳۲}$- فقط برای ژن $Lr_{۳۲}$ امکان اجرای آزمون تیپ آلودگی وجود داشت، زیرا در ایران جدایه‌هایی که بتوانند دو گروه تیپ آلودگی برای ژن $Lr_{۳۲}$ ایجاد نمایند، شناسایی گردید و برای ژن‌های دیگر مقاومت به زنگ قهوه‌ای جدایه‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا تاکنون شناسایی نشده است.

نتایج به‌دست آمده از مایه‌زنی ٦ جدایه زنگ قهوه‌ای بر روی لاین ایزوژن رقم تاچر دارای ژن مقاوم $Lr_{۳۲}$ و بولانی نشان داد که جدایه‌های ۸-۸۳، ۱-۸۵ و ۹-۸۳ جدایه‌های بیماری‌زا و ۱۲-۸٤، ۱۵-۸۵ و ۱٦-۸٤ جدایه‌های غیربیماری‌زا می‌باشند. این نتیجه با گزارش‌های مراکز تحقیقات ذکر شده

Archive of SID

www.SID.ir

در جدول ۲، مطابقت داشت (جدول ۵). پس از انتخاب جدایه‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا، مایه‌زنی جدایه‌ها در دو تکرار بر روی ارقام و لاین‌های مورد مطالعه انجام گردید. نتایج به‌دست آمده از مایه‌زنی دو جدایه ۸-۸۳ (بیماری‌زا) و ۱۲-۸٤ (غیربیماری‌زا) به‌عنوان نمونه بر روی تمام لاین‌ها و ارقام تجاری و همچنین سه رقم استاندارد در جدول ٦، گزارش گردیده است.

تجزیه داده‌های به‌دست آمده از مایه‌زنی ارقام براساس روش برودر (۱۹۷۳)، ٤۸ لاین و رقم تجاری گندم و لاین ایزوژن دارای ژن $Lr_{۳۲}$ را به سه گروه تقسیم نمود: ۱) گروه L:H که لاین ایزوژن دارای ژن $Lr_{۳۲}$ تیپ مقاومت و نمونه‌های موردنظر تیپ حساسیت نشان دادند. ارقام روشن، شعله، قدس، زرین، الوند و لاین زنجان ۷ در گروه L:H قرار گرفتند که طبق جدول ٤، می‌توان نتیجه گرفت که ارقام گروه ۱ فاقد ژن $Lr_{۳۲}$ می‌باشند، ۲) گروه H:L یعنی لاین دارای ژن $Lr_{۳۲}$ تیپ آلودگی بالا (حساس) و نمونه‌های موردنظر تیپ آلودگی پایین (مقاوم) نشان دادند؛ که این امر بیانگر نبود ژن $Lr_{۳۲}$ در ارقام گروه ۲، ولی حضور ژن(هایی) با تیپ آلودگی پایین‌تر از ژن $Lr_{۳۲}$ در این ارقام می‌باشد. ۱۷ رقم شامل ۹-۸۳- C، ۱۹-۸۳- C، ۵-۷۳-C، ٦-۸۳- C، ۱۰-۸۳- C، استارکر.کبلر-۷۲، الموت، شهریار، لاین‌های زنجان ٤، زنجان ۳، زنجان ٦، زنجان ۱۲، زنجان ۲۱، زنجان ۲۰، زنجان ۱۷، زنجان ۱۱و زنجان ۱۵ در گروه ۲ قرار گرفتند، ۳) گروه H:H و L:L که بیانگر وجود ژن(های) مشابه و یا دارای اثری مشابه با ژن $Lr_{۳۲}$ در ارقام مورد آزمایش می‌باشد. ۲۵ رقم از جمله رقم توس، سرداری، سبلان، آذر ۲، مارون، عدل، بیات، امید، اروند، گلستان، نیک‌نژاد، هیرمند، چمران، دز، تجن، مرودشت، پرستو، مهدوی و... در این گروه قرار گرفتند.

با استفاده از روش برودر (۱۹۷۳)، ژنوتیپ ۵۵ رقم تجاری گندم با استفاده از ۱۵ جدایه زنگ قهوه‌ای در مقایسه با ۱۸ لاین ایزوژن مقاوم به $Lr_{۱۹}$ و $Lr_{۲٤}$ (سنیگ و همکاران، ۲۰۰٤) و ۲۰ رقم گندم بهاره، قرمز سخت با ۲۰ جدایه زنگ قهوه‌ای در مقایسه با ۲۰ لاین ایزوژن حامل ژن‌های منفرد مقاوم به زنگ قهوه‌ای (ریزوی و استاتلر، ۱۹۸۲) تعیین و کارآیی آزمون تیپ آلودگی به‌عنوان گام اولیه جهت شناسایی ژن‌های مقاومت تأیید گردید. به‌منظور تعیین تشابهات و اختلافات بین ژنوتیپ ارقام و واکنش در مقابل جدایه‌های مختلف زنگ قهوه‌ای، ۳۰ رقم گندم زمستانه و ۲۰ لاین تقریباً ایزوژن با ۲۲ جدایه زنگ قهوه‌ای آزمایش گردید و کارآیی تجزیه و تحلیل داده‌های تیپ آلودگی به‌عنوان ابزاری با ارزش در مطالعه تغییرات ژنتیکی میزبان و جدایه تأیید شد و در ادامه با استفاده از سیستم برودر (۱۹۷۳) فنوتیپ ناشناخته ارقام نسبت به زنگ قهوه‌ای تعیین گردید (موداوی و همکاران، ۱۹۸۵).

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج به‌دست آمده از آزمون تیپ آلودگی این پژوهش نشان داد که در هر سه گروه ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای $Lr_{۳۲}$ وجود ندارد. از آنجا که ارقام مورد مطالعه در این پژوهش از مهم‌ترین ارقام گندم با سطح کشت وسیع در ایران به‌شمار می‌آیند بنابراین طراحی و اجرای برنامه‌های غنی‌سازی این ارقام از نظر ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای ضروری به‌نظر می‌رسد. شناسایی ژن‌های مقاوم به زنگ قهوه‌ای در برنامه‌های اصلاحی آتی و کشت ارقام موجود در گروه دوم به‌دلیل تیپ آلودگی پایین به‌منظور معرفی منابع ژنی جدید در مطالعات پاتولوژی پیشنهاد می‌گردد.

آزمایش‌های مولکولی: در این پژوهش به‌منظور ارزیابی حضور یا حضور نداشتن ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای $Lr_{۳۲}$ در ٤٨ لاین و ارقام تجاری مورد کشت در ایران و همچنین تعیین صحت نتایج به‌دست آمده از آزمون تیپ آلودگی، از ۲ نشانگر $S_{٤٩}$ و $S_{٤٢١}$ که به‌ترتیب با تکثیر باندهای ۱۱۰۰ و ٦٤٠ جفت بازی در ارقام مقاوم به زنگ قهوه به‌عنوان نشانگرهای پیوسته به ژن $Lr_{۳۲}$ معرفی شده بودند (پرابهو و همکاران، ۲۰۰۳) استفاده شد. طبق انتظار باندهای موردنظر در شاهد مثبت مشاهده گردید ولی در ارقام مورد آزمایش و شاهدان منفی (بولانی و آگرالوکال) تکثیری دیده نشد (شکل ۱). بنابراین با توجه به نتیجه مشاهده شده، کارآیی این دو نشانگر برای ردیابی حضور یا حضور نداشتن ژن مقاومت $Lr_{۳۲}$ تأیید گردید و برای اطمینان از تکثیر نشدن باند موردنظر در سایر ارقام و لاین‌ها، آزمایش مولکولی بیش از سه بار تکرار گردید و در هر مرحله نیز تمام احتمالات مؤثر بر تکثیر نشدن بررسی گردید اما تغییری در نتیجه به‌دست نیامد. به این ترتیب برای تکثیر نشدن باندهای موردنظر در ارقام و لاین‌های مورد مطالعه دو دلیل پیشنهاد می‌گردد: ۱) در ناحیه موردنظر یا توالی‌های احاطه‌کننده آن ممکن است تنوعات طولی از جمله حذف، اضافه، انواع جهش‌ها و... رخ داده باشد. از آنجا که نشانگرهای تصادفی رپید به تغییر در شرایط واکنش، محیط و... حساس می‌باشند پس برای پی بردن به احتمال وجود دلیل ذکر شده توالی‌یابی کروموزوم 2D– محل قرارگیری ژن مقاومت $Lr_{۳۲}$ (سرس، ۱۹۷۳)– نمونه‌های مورد بررسی و مقایسه آن با توالی باندهای موردنظر در رقم شاهد مثبت نیاز است، ۲) دومین دلیل که در شرایط فعلی قابل پذیرش و محتمل‌تر می‌باشد، مطابقت نتایج آزمایش‌های مولکولی با آزمون تیپ آلودگی یعنی نبود ژن مقاومت $Lr_{۳۲}$ در نمونه‌های مورد بررسی می‌باشد. بنابراین می‌توان ادعا کرد که تیپ آلودگی مشاهده شده در ارقام و لاین‌های گروه سوم و دوم ناشی از حضور ژن(های) با اثر مشابه با ژن مقاومت $Lr_{۳۲}$ بوده و ژن موردنظر وجود ندارد و در ارقام گروه اول نبود ژن موردنظر تأیید گردید.

با وجود گستردگی و اهمیت زنگ قهوه‌ای در ایران پژوهش‌های انجام شده با استفاده از نشانگرهای مولکولی در این زمینه بسیار انگشت‌شمار می‌باشد. این پژوهش جزء اولین پژوهش‌های در

Archive of SID

www.SID.ir

کشور به‌منظور شناسایی ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای $Lr_{۳۲}$ با استفاده از آزمون‌های تیپ آلودگی و نشانگرهای مولکولی پیوسته به ژن $Lr_{۳۲}$ به‌طور هم‌زمان بر روی ٤٨ رقم از مهم‌ترین ارقام تجاری و لاین گندم مورد کشت در ایران می‌باشد. در استراتژی معرفی نشانگرهای پیوسته به ژن بعد از شناسایی نشانگرهای تصادفی از جمله رپید و RFLP در موارد زیادی مرحله تبدیل این نشانگرها به نشانگرهای اختصاصی از جمله کپس، اسکار و STS نیز انجام می‌گیرد چرا که نشانگرهای تصادفی از جمله رپید به شرایط واکنش بسیار حساس می‌باشند و تکرارپذیری پایینی دارند در حالی‌که این مشکلات در نشانگرهای اختصاصی مرتفع گردیده است بنابراین برای تأیید نتایج به‌دست آمده از نشانگرهای رپید پیوسته به ژن مقاومت، آزمایش‌های مولکولی و تیپ آلودگی به‌طور هم‌زمان انجام پذیرفت. در این پژوهش کارآیی ٦ جدایه زنگ قهوه‌ای شناسایی شده در ایران به‌منظور استفاده در آزمون‌های تیپ آلودگی و مطالعات آتی تأیید گردید ولی وجود ژن مقاومت $Lr_{۳۲}$ در ارقام بررسی شده تأیید نشد. همچنین از بین نمونه‌های بررسی شده ارقامی شناسایی گردید که میزان مقاومت بالاتری به جدایه بیماری‌زا در مقایسه با لاین ایزوژن حاوی ژن مقاوم $Lr_{۳۲}$ از خود نشان دادند که براساس این نتایج ضمن توصیه کشت این ارقام به‌خصوص در مناطق مرطوب، مطالعات تکمیلی جهت شناسایی ژن‌های مقاومت موجود در این ارقام الزامی است. با توجه به نبود ژن $Lr_{۳۲}$ در ٤٨ رقم گندم بررسی شده در این پژوهش با استفاده از آزمون تیپ آلودگی و مولکولی، پیشنهاد می‌شود که مهم‌ترین ارقام تجاری مورد کشت در ایران را از نظر سایر ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای بررسی نموده و در صورت نبود ژن مقاوم با وارد کردن ژن‌های مقاوم در ارقام تجاری گندم، حاشیه امنیتی در خصوص بیماری زنگ قهوه‌ای در کشور ایجاد گردد.

جدول ٥- نتایج به‌دست آمده از تست لاین ایزوژن رقم تاچر حاوی ژن مقاوم $Lr_{۳۲}$ و بولانی.

ارقام استاندارد / جدایه	بولانی	تاچر حاوی ژن مقاوم $Lr_{۳۲}$
۸۳-۸	۳+	۳+
۸۳-۹	۳+	۳+
۸۵-۱	۳+	۳+
۸۵-۱۵	۳+	۱؛
۸٤-۱٦	۳+	۱؛
۸٤-۱۲	۳+	۰

Archive of SID

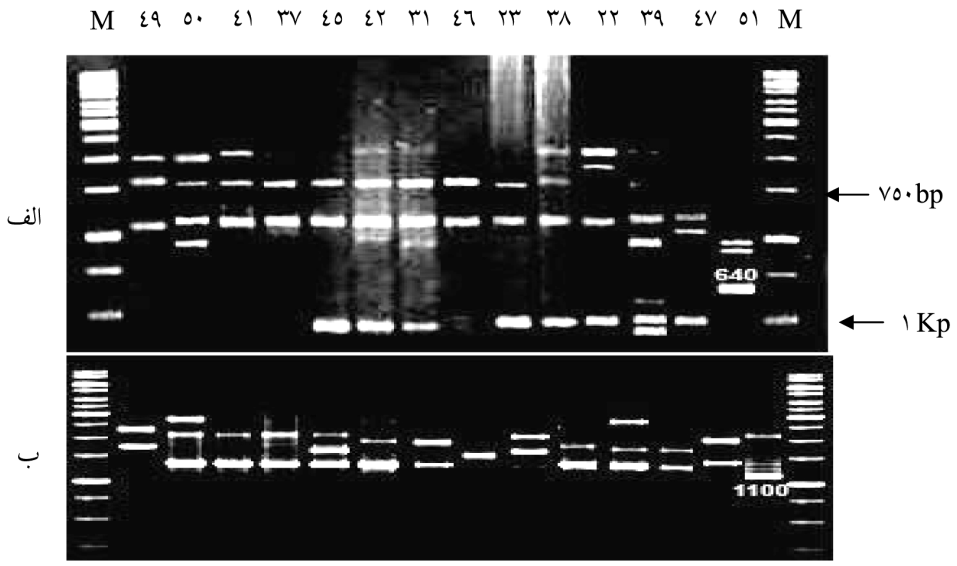
www.SID.ir

جدول ٦- نتایج به‌دست آمده از تست ارقام تجاری و ارقام استاندارد با استفاده از جدایه‌های بیماری‌زا (۸-۸۳) و غیربیماری‌زا (۱۲-۸۳).

تیپ واکنش به جدایه ۱۲-۸٤	تیپ واکنش به جدایه ۸-۸۳	ارقام	تیپ واکنش به جدایه ۱۲-۸٤	تیپ واکنش به جدایه ۸-۸۳	ارقام
۲	۲+	شهریار	۰	۱؛	C-۸۳-۱۰
۰	۳+	توس	۰	۱؛	C-۸۳-۹
۰	۳+	سرداری	۰	۰	C-۸۳-۱۹
۱؛	۳+	سبلان	۰	۱؛	C-۸۳-٦
۱؛	۳+	آذر ۲	۰	۱؛	C-۷۳-٥
۰	۳+	مارون	۰	۳+	C-۸۰-۱٦
۰	۳+	عدل	۰	؛+	زنجان ۳
۰	۳+	بیات	۰	۱؛	زنجان ٤
۲	۳+	قدس	۰	۳+	زنجان ٥
۳+	۳+	شعله	۰	۱؛	زنجان ٦
۰	۳+	امید	۲+	۳+	زنجان ۷
۰	۳+	اروند	۰	۳+	زنجان ۸
۳+	۳+	روشن	۰	۳+	زنجان ۹
۰	۳+	گلستان	۰	۳+	زنجان ۱۰
۰	۳+	نیک‌نژاد	۰	۱؛	زنجان ۱۱
۰	۳+	هیرمند	۰	۲+	زنجان ۱۲
۰	۳+	چمران	۰	۳+	زنجان ۱۳
۰	۳+	دز	۰	۲؛	زنجان ۱٥
۰	۳+	تجن	۱؛	۲؛	زنجان ۱۷
۰	۳+	مرو دشت	۰	۳+	زنجان ۱۸
۰	۳+	پرستو	۰	۲	زنجان ۲۰
۰	۲+	الموت	۰	x	زنجان ۲۱
۰	۳+	مهدوی	۰	x	استارکر.کبلر-۷۲
۰	۳+	رقم تاچر دارای ژن $Lr_{۳۳}$	۳+	۳+	زرین
۳+	۳+	بولانی	۱؛	۳+	پیشتاز
۳+	۳+	اگرالوکال	۳+	۳+	الوند

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- الگوی تکثیر نشانگر S_{421} (الف) و S_{49} (ب) پیوسته به ژن مقاوم به زنگ قهوه‌ای Lr_{22a}. کدها از راست به چپ (نشانگر اندازه، تاچر، مرودشت، دز، مهدوی، چمران، آذر ۲، سرداری، روشن، شهریار، توس، هیرمند، الوند، آگرولوکال، بولانی).

منابع

1.Arzani, A., Ahun-Manesh, A. and Torabi, M. 2006. A study of resistance genetic of adult plants to brown rust in wheat (*Triticum aestevum*). Iran, J. Agric. Sci. 2: 363-373.

2.Autrique, E., Singh, R.P., Tanksley, S.D. and Sorrells, M.E. 1995. Molecular marker for four leaf rust resistance genes intro grassed into wheat from wild relatives. Genome. 38: 75-83.

3.Bamdadeian, A. 1993. Evaluation of physiological race of rusts of grass and their modification in Iran. Institute of Evaluation Pests and Plant Disease, Evin, Iran. Press, 10p. (In Persian)

4.Browder, L.E. 1973. Probable genotype of some *Triticum aestivum* Agent derivatives for reaction to *Puccinia recondite f.sp. tritici*. Crop Sci. 13: 203-206.

5.Chelkowski, J. and Steien, L. 2001. Molecular markers for leaf rust resistance genes in wheat. Theor. Appl. Genet. 102: 117-126.

6.Chelkowski, J., Golka, L. and Steien, L. 2003. Application of STS markers for leaf rust resistance genes in near-isogenic lines of spring wheat cv. Thatcher. Theor. Appl. Genet. 107: 323-338.

Archive of SID

www.SID.ir

7.Cherukuri, D.P., Gupta, S.K., Charpe, A., Koul, S., Prabhu, K.V., Singh, R.B., Haq, Q.M.R. and Chauhan, S.V.S. 2003. Identification of molecular marker linked to an *Agropyron elongatum*-derived gene Lr_{19} for leaf rust resistance in wheat. Plant Breeding, 122: 204-208.
8.Esfandeiari, A. 1948. The rusts of grass in Iran. J. Pests and Plant Dis. 4: 76-77. (In Persian)
9.Gupta, S.K., Charpe, A., Koul, S., Prabhu, K.V. and Haq, Q.M.R. 2005. Development and molecular linked to an *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene, Lr_9, for marker-assisted seletion in bread wheat. Genome. 48: 823-830.
10.Karemi, H. 1993. Wheat. Tehran Univ. Press, 354p. (In Persian)
11.Knott, D.R. 1989. The wheat rusts-breeding for resistance. Springer-Verlag, Berlin, 201p.
12.Loegering, W.Q. and Browder, L.E. 1971. A system on nomenclature for physiologic races of *Puccinia recondita tritici.* Plant Dis. 55: 719-722.
13.McCartney, C.A., Somers, D.J., McCallum, B.D., Thomas, J., Humphreys, D.G., Menzies, J.G. and Brown, P.D. 2004. Microsatellite tagging of the leaf rust resistance gene Lr_{16} on wheat chromosome 2B. Molecular Breeding, 15: 329-337.
14.McIntosh, R.A., Wellings, C.R. and Park, R.F. 1995. Wheat rust: An atlas of resistance gene. CSIRO Publications, Victoria, Australia, 250p.
15.Moeni, R. and Bamdadeian, A. 1994. Distribution of yellow and brown rust disease of wheat in Zanjan Region. 11th Congress of Plant Pathology, Iran, 44p. (In Persian)
16.Moeni, R. 1998. Evaluation of disease of wheat and barely and amount of infection and dispread in Zanjan Region. Fani. Press, 52: 12-16. (In Persian)
17.Modawi, R.S., Browder, L.E. and Heyne, E.G. 1985. Use of infection-type data to identify genes for low reaction to *Puccinia recondite* in several winter wheat cultivars. Crop Sci. 25: 9-13.
18.Naghavi, M.R., Ghariazi, B. and Hosseini Salekdeh, G. 2006. Molecular markers. Tehran Univ. Press, 317p. (In Persian)
19.Naik, S., Gill, K.S., Prakasa Rao, V.S., Gupta, S.A., Tamhankar, S., Pujar, B.S. and Ranjekar, P.K. 1998. Identification of a STS marker linked to the *Aegilops speltoides*-derived leaf rust resistance gene Lr_{28} in wheat. Theor. Appl. Genet. 97: 535-540.
20.Prabhu, K.V., Gupta, S.K., Charpe, A., Koul, S., Cherukuri, D.P., Dhaliwal, H.S., Vikal, Y., Chhuneja, P. and Haq, Q.M. 2003. Molecular markers detect redundancy and miss-identity in genetic stocks with alien leaf rust resistance genes Lr_{32} and Lr_{28} in bread wheat. Plant Biochem. and Biotechnol. 12: 123-129.

Archive of SID

www.SID.ir

21.Prabhu, K.V., Gupta, S.K., Charpe, A. and Koul, S. 2004. SCAR marker tagged to the alien leaf rust resistance gene Lr_{19} uniquely marking the *Agropyron elongatum*-derived gene Lr_{24} in wheat. Plant Breeding, 123: 417-420.
22.Prins, R., Groenewald, J.Z., Marais, G.F., Snape, J.W. and Koebner, R.M.D. 2001. AFLP and STS tagging of Lr_{19}, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. Theor. Appl. Genet. 103: 618-624.
23.Rizvi, S.S.A. and Statler, G.D. 1982. Probable genotypes of hard red spring wheat for resistance to *Puccinia recandita f.sp.tritici.* Crop Sci. 22: 1167-1170.
24.Roelf, A.P., Singh, P.R. and Saari, E.E. 1992. Rust diseases of Wheat concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico, 81p.
25.Schachermayr, G.M., Siedler, H., Gale, M.D., Winzeler, H., Winzeler, M. and Keller, B. 1994. Identification and localization of molecular marker linked to the Lr_9 leaf rust resistance gene of wheat. Theor. Appl. Genet. 88: 110-115.
26.Sears, E.R. 1973. *Agropyron*-wheat transfer induced by homoeologous pairing. Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp, Pp: 191-199.
27.Singh, R., Datta, D., Singh, S. and Tiwari, R. 2004. Marker-assisted selection for leaf rust resistance genes Lr_{19} and Lr_{24} in wheat *triticum aestivum* L. Theor. Appl. Genet. 108: 399-403.
28.Shiwani, M. and Saini, R.G. 1993. Diversity for resistance to leaf rust in *Triticum aestivum.* Plant Dis. 77: 359-363.
29.Statler, G.D. 1984. Probable genes for leaf rust resistance in several hard red spring wheat. Crop Sci. 24: 883-886.
30.Vikal, Y., Chhuneja, R., Singh, R. and Dhaliwal, H.S. 2004. Tagging of an *Aegilops speltoides* Derived Leaf Rust Resistance Gene Lr_{28} with a microsatellite marker in wheat. Plant Biochem. and Biotechnol. 13: 47-49.

Archive of SID

www.SID.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Plant Production, Vol. 17(3), 2010
www.gau.ac.ir/journals

Detection of leaf rust resistance gene Lr_{32} in Iranian wheat varieties and lines using infection-type data test and molecular markers linked to the Lr_{32}

A. Shafie[1], B. Maleki Zanjani[2], *S. Karami[3] and F. Imani Khah[1]
[1]M.Sc. Graduated, Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Zanjan University,
[2]Assistant Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Zanjan University,
[3]Faculty Member, Dept. of Agronomy, Payame Noor University (PNU), Khuzestan
Received: 8,12,2009 ; Accepted: 30,10,2010

Abstract

Puccinia recondite (Leaf rust) is an endemic disease in Iran; this disease can affect the productivity and quality of wheat, that occurring in all wheat growing regions. Genetic resistance to leaf rust of wheat is the most important strategy to control the diseases and 51 leaf rust resistance genes (*Lr* gene) are reported in wheat to provide resistance to leaf rust. This study aims to identify presence or absence of leaf rust resistance gene Lr_{32} in 48 Iranian wheat cultivars and lines using of infection-type data test and molecular markers linked to the leaf rust resistance gene. Infection-type analysis based on international method of Browder (1973) with 6 leaf rust pathotype known in Iran, revealed that, first, 17 out of 48 cultivars and lines have effective resistance to race virulence of leaf rust gene Lr_{32}, second, 25 cultivars and lines foresight probability presence resistance gene Lr_{32} or genes with similar effect, and at last, absence of leaf rust resistance gene Lr_{32} revealed in 6 cultivars and lines. In molecular part, using known RAPD molecular markers (S_{49} and S_{421}), evaluated possibility of present of 1100 bp and 640 bp fragments that closely linked to leaf rust resistance gene Lr_{32} in 48 wheat cultivars and lines. In according with expectation, detected 1100 bp and 640 bp fragments in near-isogonic's *Lr* gene but none of cultivars, lines and negative control line (Bolani and Agra Local), showed amplification related resistance gene fragments. Result of molecular Markers and infection-type data test showed absence of leaf rust resistance gene Lr_{32} in 48 Iranian wheat cultivars and lines.

Keywords: Leaf rust, Wheat, Lr_{32} gene, Infection-type, Molecular markers

* Corresponding Author; Email: karamisoraya@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir