Crop Biotech.
Autumn (2014) 7: 49-58.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره هفتم، پاییز ۱۳۹۳ (۵۸-۴۹)

بررسی حضور جایگاه‌های ژنی مرتبط با مقاومت به زنگ زرد، سیاه و قهوه‌ای در ارقام گندم در دست معرفی با استفاده از نشانگرهای مولکولی

رحیم مهرابی[۱]*، محسن سرهنگی[۲]، الهام الا حسنی[۳]، حبیب‌اله قزوینی[۴]، فرزاد افشاری[۵]
۱، ۲، ۳، ٤، ٥. به ترتیب استادیار، کارشناسان آزمایشگاه، استادیار و استاد، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، بخش تحقیقات غلات، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۱۷- تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۹/۲۰)

Study on the presence of resistance gene loci to yellow, stem and leaf rust diseases using molecular markers in pre-released wheat lines

R. MEHRABI[1]*, M. SARHANGI[2], E. ALA-HASSANI[3], H. GHAZVINI[4], F. AFSHARI[5]
1, 2, 3, 4, 5. Assistant Professor, Laboratory Technicians, Assistant Professor and Professor, Cereal Research Department, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran
(Received: Oct. 9, 2014 - Accepted: Dec.12, 2014)

چکیده

زنگ زرد، قهوه‌ای و سیاه گندم از پر خسارت‌زاترین بیماری‌های گندم در ایران و جهان هستند. استفاده از ارقام مقاوم به این بیماری‌ها، موثرترین و اقتصادی‌ترین روش کنترل آن‌ها می‌باشد. در حال حاضر برای تعداد قابل توجهی از ژن‌های مقاومت به این سه بیماری، نشانگرهای مولکولی مرتبط شناخته شده است. در این تحقیق ارقام گندم نان در دست معرفی چهار اقلیم کشور جهت تشخیص حضور و عدم حضور ژن‌ها و یا جایگاه‌های ژنی مقاومت در مرحله گیاه کامل و گیاهچه‌ای شامل *Lr46/Yr29/Pm39*، *Lr34/Yr18/Pm38*، *Lr67/Yr46*، *Sr2/PBC*، *Sr24/Lr24*، *Sr26*، *Sr31/Yr9/Lr26*، *L21*، *Sr38/Yr17/Lr37*، *Srcad* و *Lr29* با استفاده از نشانگرهای مولکولی پیوسته با آن‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که جایگاه‌های ژنی *Lr46/Yr29/Pm39*، *Lr34/Yr18/Pm38* هر کدام در ٤ لاین، *Lr67/Yr46* در ٥ لاین، و جایگاه‌های ژنی *Sr31/Yr9/Lr26* و *Sr38/Yr17/Lr37* نیز هر کدام فقط در یک لاین دیده شدند. سایر جایگاه‌های ژنی در هیچ‌کدام از لاین‌های مورد بررسی مشاهده نشدند. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که فراوانی حضور این ژن‌ها در ارقام در دست معرفی پایین بوده و بنابراین باید در برنامه‌های اصلاح برای مقاومت به این بیماری‌ها از لاین‌های حاوی ژن‌های مقاومت استفاده گردد تا باعث افزایش فراوانی حضور این ژن‌ها در ارقام اصلاح شده شود.

واژه‌های کلیدی: گندم، زنگ سیاه، زنگ زرد، زنگ قهوه‌ای، نشانگرهای مولکولی

Abstract

Yellow, leaf and stem rusts are among the most devastating diseases of wheat in Iran and worldwide. The use of resistant cultivars is the most effective and economic approach to control these diseases. To date, a significant number of molecular markers linked to the resistance loci to these diseases have been identified. In this study, pre-released wheat lines of four major wheat climate zones of Iran were evaluated for the presence or absence of molecular markers linked to 11 resistance loci including *Lr46/Yr29/Pm39, Lr34/Yr18/Pm38*, *Lr67/Yr46, Sr2/PBC, Sr24/Lr24, Sr26, Sr31/Yr9/Lr26, L21, Sr38/Yr17/Lr37, SrCad* and *Lr29*. The results showed that *Lr46/Yr29/Pm39, Lr34/Yr18/Pm38* and *Lr67/Yr46* loci existed in four and five genotypes, respectively, while *Sr31/Yr9/Lr26* and *Sr38/Yr17/Lr37* loci existed only in one genotype. The remaining genotypes did not possess markers linked to resistance loci tested in this study. The results showed that the frequency of presence of these loci in pre-released lines is low and, thus, lines possessing the resistance loci should be incorporated in wheat breeding programs in order to increase the frequency of the resistance genes in new cultivars.

Keywords: Wheat, Stem rust, Yellow rust, Leaf rust, Molecular markers

* نویسنده مسئول: رحیم مهرابی
E-mail: rahim.mehrabi@gmail.com

مقدمه

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) یکی از با ارزش‌ترین گیاهان زراعی جهان است که بخش عمده‌ای از نیاز غذایی بشر را فراهم کرده و در ایران نیز مهم‌ترین محصول استراتژیک به شمار می‌رود. همواره بخش قابل ملاحظه‌ای از محصول تولید شده بر اثر تنش‌های زنده و غیرزنده از بین می‌رود. زنگ زرد، قهوه‌ای و سیاه گندم از جمله مهم‌ترین تنش‌های زنده خسارت‌زای گندم در جهان و همچنین شرایط اقلیمی ایران می‌باشند. بیماری زنگ سیاه توسط قارچ *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* ایجاد شده و در شرایط همه‌گیری خسارت قابل توجهی به محصول گندم وارد می‌نماید. در سال ۱۹۹۹ بروز پاتوتیپ جدید زنگ سیاه (Ug99) با شدت بیماری‌زایی بالا ابتدا از اوگاندا گزارش شد و پس از آن در سال ۲۰۰۱ در کنیا، ۲۰۰۳ در اتیوپی و در ۲۰۰۷ در یمن و ایران نیز مشاهده گردید (Nazari *et al*., 2009). برای چندین دهه ژن *Sr31* به‌واسطه ایجاد مقاومت در برابر نژادهای مختلف زنگ سیاه در ریخته ژنتیکی اکثر ارقام گندم مورد استفاده قرار گرفته بود، اما با ظهور نژاد Ug99 مقاومت پردوام و موثر ژن *Sr31* شکسته شد و موجی از نگرانی جهانی برای شیوع بیماری زنگ سیاه ایجاد گردید. همان‌گونه که پیش‌بینی شده بود نژاد Ug99 از اوگاندا به اتیوپی و سودان گسترش پیدا کرد و احتمالاً از این مسیر به ایران رسیده و در آینده به شبه قاره هند گسترش یابد (Singh *et al*., 2004). پس از شکسته شدن بیش از سه دهه مقاومت ژن *Sr31* توسط نژاد Ug99، جستجو برای دست‌یابی به منابع جدید مقاومت آغاز شده است، ولی باید در نظر داشت که تعداد ژن‌های مقاومت در برابر Ug99 بسیار محدود بوده و در ضمن در ریخته ارثی تمامی ارقام رایج در مناطق مختلف جهان وجود ندارند. از جمله این ژن‌ها که توانسته‌اند مقاومت خوبی را در برابر این پاتوتیپ جدید نشان دهند، می‌توان ژن‌های *Sr2*، *Sr24*، *Sr25*، *Sr26*، *Sr38*، *Sr39*، *SrAmigo* و *SrCad* را نام برد.

بیماری زنگ زرد گندم توسط بیمارگر قارچی با نام علمی *P. striiformis* f.sp. *tritici* ایجاد شده که یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زای گندم در اکثر نقاط دنیا به حساب می‌آید. میزان خسارت این بیماری در ایران در سال ۱۹۹۴ حدود ۱/۵ میلیون تن برآورده شد که در مجموع حدود ۱۵٪ از کل محصول گندم کشور را شامل می‌گردید (Torabi *et al*., 1995). زنگ قهوه‌ای گندم با عامل *P. triticina* از بیماری‌های مهم گندم در دنیا بوده و احتمالاً گسترده‌ترین دامنه انتشار را دارد. در ایران نیز عامل بیماری در تمام مناطق کشور خصوصاً در استان‌های غربی، خوزستان، سواحل دریای خزر و استان سیستان و بلوچستان وجود داشته و بویژه در سال‌های اپیدمی خسارت سنگینی به این محصول وارد می‌کند. اپیدمی زنگ قهوه‌ای در پاکستان در سال ۱۹۷۸ خسارتی برابر ۸۶ میلیون دلار داشته است (Hussain *et al*., 1980). Abdel hak و همکاران (1980) میزان خسارت زنگ قهوه‌ای در مصر را تا ۵۰٪ کاهش محصول برآورد کرده‌اند (Abdel hak *et al*., 1980). در نواحی مختلف با توجه به شرایط آب و هوایی میزان اهمیت زنگ‌های گندم متفاوت است. از جمله جایگاه‌های ژنی مقاومت به زنگ قهوه‌ای *Lr21*، *Lr29*، *Lr34*، *Lr46* و *Lr67* را می‌توان نام برد که از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند (Mohammadi *et al*., 2013).

ژن‌های مقاومت برای زنگ‌های گندم به دو دسته ژن‌های مقاومت در مرحله گیاهچه‌ای (Seedling Resistance Genes) و ژن‌های مقاومت در مرحله گیاه کامل (Adult Plant Resistance Genes) تقسیم می‌شوند. ژن‌های مقاومت در مرحله گیاهچه‌ای دارای مقاومت اختصاصی و تک ژنی به عامل بیماری‌زا هستند و به همین دلیل عمر اثر و محبوبیت آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی کوتاه می‌باشد زیرا بروز تغییرات

ژنتیکی عامل بیماری ممکن است باعث شکست مقاومت یک ژن اختصاصی گردد. در مقابل استفاده از ژن‌های مقاومت در گیاه کامل می‌تواند با بروز مقاومتی غیراختصاصی و پلی‌ژنیک، مقاومت متوسطی در برابر طیف وسیعی از نژادهای عامل بیماری ایجاد کند که عمر اثر بسیار بالاتری از مقاومت تک‌ژنی دارد و موجب حفاظت از ارقام تحت اثر شدید بیماری می‌شود. به همین دلیل است که اصلاح‌گران از ژن‌های مقاومت گیاه کامل نیز با تأکید در کنار ژن‌های مقاومت گیاهچه‌ای استفاده می‌کنند. در این تحقیق ارقام گندم نان در دست معرفی چهار اقلیم کشور جهت تشخیص حضور و عدم حضور جایگاه‌های ژنی مقاومت در مرحله گیاه کامل و ژن‌های مقاومت در مرحله گیاهچه‌ای با استفاده از نشانگرهای مولکولی پیوسته مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی این تحقیق شامل ۲۲ رقم گندم نان در دست معرفی چهار اقلیم کشور می‌باشد (جدول ۱) که توسط ۱۱ نشانگر مولکولی ارزیابی شدند (جدول ۲). بذر لاین‌های مورد بررسی در گلدان‌های پلاستیکی کشت گردید و در مرحله ۳ برگی استخراج DNA از برگ‌های جوان با استفاده از روش CTAB انجام شد (Saghai-Maroof *et al*., 1984). کیفیت DNA استخراج شده از نظر خصوصیات کمی و کیفی شامل غلظت، شکستگی و وجود یا عـدم وجود RNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز بررسی گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر برای هر واکنش با استفاده از PCR Buffer (1X)، آغازگرهای موردنظر برای هر ژن یا بلوک ژنی (۲۰۰nM)، آنزیم تگ‌پلیمراز (۱ unit)، dNTPs به میزان ۰/۲ mM، $MgCl_2$ به میزان ۲ mM و DNA به میزان ۵۰ ng برای هر واکنش انجام شد. برنامه حرارتیPCR به طور کلی به صورت یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل

جدول ۱- نام و شجره لاین‌های گندم دردست معرفی چهار اقلیم کشور مورد استفاده در این پژوهش

No.	Code	Pedigree
1	S-90-6	Alborz/5/K62909/4/Cno/K58/Tob/3/Wa/5/Chen/Aeg.sq(Taus)//BCNY3/6/Alborz/5/ K62909/4/Cno//K58/Tob/3/Wa
2	S-90-4	Bow"s"/Vee"s"//1-60-3/3/Cocoraque 75/4/Chamran
3	S-90-5	IR/FR
4	S-90-7	Alborz/5/K62909/4/Cno/K58/Tob/3/Wa/5/Chen/Aeg.sq (Taus)//BCN Y3/6/Alvand//Aldan"s"/Las58
5	C-85-3	Ghk"S"/Bow"S"//90Zong87/3/Shiroodi
6	S-87-18	CBRD-3/STORK X DICOCCOIDES
7	MS-87-9	Desprez80/Rsh//1-66-22/Inia
8	MS-87-8	1-66-22/3/Alvd//Aldan/Las
9	S-87-20	OASIS/SKAUZ//4*BCN/3/2*PASTOR
10	WS-90-10	Falat/Barakat/ 5/Omid/4/ Bb/Kal//Ald/3/Y50E/3*Kal/Emu
11	WS-90-18	CROC_1/AE.SQUARROSA (2247)//OPATA/3/PASTOR
12	WS-89-7	Kauz/Pastor/PBW343
13	C-88-4	Gascogen/Col No.3625//Alamoot
14	N-90-7	OASIS/SKAUZ//4*BCN/3/2*PASTOR
15	N-90-12	BABAX/LR42//BABAX*2/3/VIVITSI
16	N-87-20	SABUF/7/ALTAR 84/AE SQUARROSA (224)/ YACO/6/CROC_1…/
17	M-90-7	Bow"s"/Vee"s"//1-60-3/3/Cocoraque 75/4/Chamran
18	M-90-9	IR/FR (Aldric)
19	M-90-16	SHARP/3/PRL/SARA/TSI/VEE#5/5/VEE/LIRA//BOW/3/BCN/4/KAUZ
20	WS-89-6	Pishtaz//Falat/Barakat
21	DW-81-18	Sora/2*Plala12
22	S-90-3	Pishtaz//Falat/Barakat

جدول ۲- نشانگرهای مولکولی مورد استفاده، جایگاه ژنی، دمای اتصال و اندازه باند مورد انتظار برای نشانگرهای مورد استفاده

No.	Locus	Marker name	Forward 5´-3´	Reverse 5´-3´	Allele size (bp)
1	*Lr34/Yr18/Pm38*	caSNP4	GCGTTTCTGTCACCAGAAGT	AATAAACTCGCGCCTCTTGA	390
		caSNP12	TCCCCAGTTTAACCATCCTG	CATTCAGTCACCTCGCAGC	234
		csLV34	GTTGGTTAAGACTGGTGATGG	TGCTTGCTATTGCTGAATAGT	150
2	*Lr46/Yr29/Pm39*	Barc80	GCGAATTAGCATCTGCATCTGTTTGAG	CGGTCAACCAACTACTGCACAAC	110
3	*Lr67/Yr46*	CFD71	CAATAAGTAGGCCGGGACAA	TGTGCCAGTTGAGTTTGCTC	214
4	*Sr2/PBC*	csSr2	AAGGGTTGCTAGGATTGGAAAAC	AGATAACTCTTATGATCTTACATTTTTCTG	172/112/53
5	*Sr24/Lr24*	Sr24#50	CCCAGCATCGGTGAAAGAA	ATGCGGAGCCTTCACATTTT	200
6	*Sr26*	BE518379	AGCCGCGAAATCTACTTTGA	TTAAACGGACAGAGCACACG	303
		Sr26#43	AATCGTCCACATTGGCTTCT	CGCAACAAAATCATGCACTA	207
7	*Sr31/Yr9/Lr26*	Iag95	CTCTGTGGATAGTTACTTGATCGA	CCTAGAACATGCATGGCTGTTACA	1100
8	*Sr38/Lr37/Yr17*	Ventriup-Ln2	AGGGGCTACTGACCAAGGCT	TGCAGCTACAGCAGTATGTACACAAAA	259
9	*Lr21*	KSUD14-STS	CGCTTTTACCGAGATTGGTC	TCTGGTATCTCACGAAGCCTT	669
10	*Lr29*	Lr29F24 Lr29R24	GTGACCTCAGGCAATGCACACAGT	GTGACCTCAGAACCGATGTCCATC	900
11	*Sr cad*	FSD-RSA	GTTTTATCTTTTTATTTC	CTCCTCCCCCCA	275

مراحل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال بسته به دمای اتصال نشانگرها به مدت ۳۰ ثانیه (جدول ۲) و مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و در خاتمه یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم گردید. سپس محصولات حاصل ازPCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ یا پلی‌اکریلامید ۶٪ (بسته به نوع نشانگر) تفکیک و با استفاده از محلول اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی و توسط اشعه UV در دستگاه ژل داکیومنت عکس‌برداری شدند. نمره‌دهی آلل‌ها توسط مقایسه با مارکر وزنی به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) انجام گرفت.

نتایج و بحث

آزمون ژنتیکی جایگاه ژنی *Lr34/Yr18/pm38*

این جایگاه ژنی اولین بار توسط Dyck (۱۹۸۷) با استفاده از تجزیه QTL بر روی بازوی کوتاه کروموزوم 7D نقشه‌یابی شد. این جایگاه ژنی حاوی ژن *Yr18* مقاومت به زنگ زرد (*P. striiformis*)، ژن *Pm38* مقاومت به سفیدک پودری(*B. graminis*) و ژن *Lr34* مقاومت به زنگ قهوه‌ای می‌باشد (Spielmeyer *et al.,* 2005; Singh, 1992). این جایگاه ژنی حاوی ژن‌های مقاومت در مرحله گیاه کامل بوده که مقاومت غیراختصاصی و پردوامی را در گیاه کامل را ایجاد می‌کند (Krattinger *et al.*, 2009). در این تحقیق برای بررسی این جایگاه ژنی از یک نشانگر مولکولی STS به نام csLV34 و دو نشانگر SNP به نام‌های caSNP4 و caSNP12 استفاده شد. نشانگر csLV34 در صورت وجود آلل مقاومت، باندی به اندازه ۱۵۰bp و در صورت عدم وجود آلل مقاومت باندی به اندازه ۲۲۹bp را روی ژل آگارز ۱/۵٪ تشکیل می‌دهد. دو نشانگر caSNP4 و caSNP12 ازجمله ترین نشانگرها به جایگاه ژنی مورد نظر و دارای پیوستگی بسیار بالایی با آن هستند. محصولات PCR این دو نشانگر در صورت وجود ژن مقاومت به ترتیب دارای قطعه‌ای به اندازه ۳۹۰bp و ۲۳۴bp و در صورت عدم وجود ژن هیچ قطعه‌ای در هر دو نشانگر تکثیر نمی‌شود (Dakori *et al*, 2010). آزمون ژنتیکی حضور جایگاه ژنی *Yr18/Lr34/Pm38* در لاین‌های مورد بررسی با استفاده از این سه نشانگر نشان داد که تنها در لاین‌های MS-87-9، MS-87-8، WS-89-6 و DW-81-18 این جایگاه ژنی مرتبط با مقاومت در گیاه کامل وجود دارد (شکل ۱). Mohammadi و همکاران (۲۰۱۳) نیز در بررسی این جایگاه ژنی در ارقام و لاین‌های گندم نان با نشانگر csLV34 نشان دادند که ارقام و لاین‌های Wangshubai، Ws-86-14، اینیا، کاوه، مغان ۱، اترک، MV-17، ارگ، بم، نیک نژاد، MS-85-17، و نیشابور واجد بلوک ژنی مقاومت گیاه کامل *Lr34/Yr18/Pm38* بودند (Mohammadi *et al*, 2013).

شکل ۱- الگوی DNA جایگاه ژنی *Lr34/Yr18/Pm38* در لاین‌های در دست معرفی چهار اقلیم کشور با استفاده از نشانگرهای caSNP4، caSNP12 و csLV34 که به ترتیب آلل جایگاه ژنی به اندازه 390bp، 234bp و 150bp/229bp را تکثیر می‌نمایند.

آزمون ژنتیکی جایگاه ژنی *Lr46/Yr29/Pm39*

ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای *Lr46* همانند ژن *Lr34* ازجمله ژن‌های مقاومت در مرحله گیاه کامل محسوب می‌شود که مقاومت متوسط ولی پردوامی را در گیاه کامل ایجاد می‌کند. *Lr46* برای اولین بار توسط Singh و همکاران (۱۹۹۸) در واریته Pavon76 معرفی شد. سپس William و همکاران (۲۰۰۳) توانستند با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP محل این ژن را بر روی قسمت انتهایی کروموزوم 1BL نقشه‌یابی کنند. همچنین مشخص شد که ژن *Lr46* دارای پیوستگی بالا و یا خاصیت چند اثری (Pleiotropy) با ژن مقاومت به زنگ زرد *Yr29* (William *et al.*, 2003) و ژن مقاومت به سفیدک پودری *Pm39* می‌باشد (Lillemo *et al.*, 2008). آزمون ژنتیکی برای ردیابی این جایگاه ژنی با استفاده از نشانگر مولکولی ریزماهواره XBarc80 صورت گرفت. در این تحقیق از رقم Pavon76 به عنوان کنترل مثبت برای شناسایی آلل مؤثر مقاومت استفاده شد. الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید نشان داد که ۴ لاین احتمالا" حاوی این جایگاه ژنی می‌باشند که برای اطمینان نیاز به استفاده از نشانگرهای پیوسته‌تر با این جایگاه ژنی می‌باشد.

آزمون ژنتیکی جایگاه ژنی *Lr67/Yr46*

ژن *Lr67* برای اولین بار در گندم نان PI250413 معرفی شد و بعد از آن از طریق تلاقی برگشتی به لاین RL6077 (Thatcher*6/PI250413) منتقل گردید (Hiebert *et al.,* 2010). در ابتدا این نظریه وجود داشت که مقاومت در RL6077 به دلیل ژن مقاومت *Lr34* بر روی کروموزوم 7D است که از طریق جابجایی کروموزومی به مناطق دیگر انتقال یافته است. اما بعد از مدتی Lagudah و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که ژن *Lr34* در RL6077 وجود ندارد. سپس هیبرت و همکاران (۲۰۱۰) با استفاده از نشانگرهای مولکولی و تجزیه‌های سیتوژنتیکی نشان دادند که در رابطه با کروموزوم 7D هیچ جابجایی در RL6077 وجود ندارد و همچنین آنها توانستند محل ژن *Lr67* را روی کروموزوم 4D نقشه‌یابی کنند. این جایگاه ژنی همانند جایگاه‌های ژنی *Lr34/Yr18/Pm38* و *Lr46/Yr29/Pm39* ازجمله ژن‌های مقاومت غیر اختصاصی به‌شمار می‌رود که مقاومت در گیاه کامل را کد می‌کند. بررسی حضور و یا عدم حضور جایگاه ژنی *Lr67/Yr46* در این تحقیق با استفاده از نشانگر مولکولی Cfd71 انجام شد. این نشانگر که یک نشانگر ریزماهواره است، پیوستگی بالایی با ژن مورد نظر دارد و در صورت تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۲۱۴bp در واکنش PCR بیانگر احتمال بالای وجود جایگاه ژنی مقاومت *Lr67/Yr46* می‌باشد (Hiebert *et al.*, 2010). نتایج حاصل از بررسی محصولات PCR این نشانگر با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید ۶٪ حاکی از آن بود که جایگاه ژنی *Lr67/Yr46* در لاین‌های S-90-6، M-90-9، MS-87-8، WS-90-10 و S-90-3 وجود دارد.

آزمون ژنتیکی جایگاه ژنی Sr2/Pseudo Black Chaff (PBC)

ژن *Sr2* یکی از مهم‌ترین ژن‌های کنترل کننده مقاومت در گیاه کامل به زنگ سیاه در گندم است که همراه با ژن Pseudo-black chaff (PBC) در یک جایگاه ژنی روی قسمت انتهایی بازوی کوچک

کروموزوم 3B قرار دارند (McIntosh *et al.*, 1995). این ژن توانسته است مقاومت نسبتاً خوبی را در ۶۰ سال گذشته نسبت به زنگ سیاه با توارث مغلوب از خود بروز دهد (Spielmeyer *et al.*, 2003). اصلاح نباتات به روش کلاسیک برای *Sr2* معمولا کار دشواری است، زیرا این ژن دارای توارث مغلوب بوده و همچنین بروز فنوتیپی آن در مرحله گیاه کامل رخ می‌دهد که می‌تواند توسط محیط یا سایر مکان‌های ژنی تحت تأثیر قرار بگیرد. تاکنون نشانگرهای مولکولی متعددی برای بررسی این جایگاه ژنی معرفی شده است ولی در این میان نشانگر csSr2 دارای دقت بسیار بالاتری است (Mago *et al.*, 2010). نشانگر csSr2 از گروه نشانگرهای CAPS به شمار می‌رود که با ژن *Sr2* پیوستگی بالایی نشان داده است. محصولات PCR حاصل از این نشانگر پس از برش با آنزیم برشی *BspH*I روی ژل آگارز ۲/۵ درصد به ۳ حالت ممکن است مشاهده شوند: ۱- هیچ باندی مشاهده نشود ۲- دو قطعه با اندازه‌های ۲۲۵bp و ۱۱۲bp مشاهده شود و ۳- سه قطعه با اندازه‌های ۱۷۲bp، ۱۱۲bp و ۵۳bp مشاهده شود که فقط حالت سوم نشان دهنده وجود ژن مقاومت *Sr2* در گیاه کامل می‌باشد (Mago *et al.*, 2010). نتایج آزمون ژنتیکی با این نشانگر نشان داد که هیچ کدام از لاین‌های مورد بررسی در این تحقیق دارای جایگاه ژنی مورد نظر نمی‌باشند. در پژوهشی Mohammadi و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از نشانگر ریزماهواره gwm533 گزارش دادند که ارقام و لاین‌های اصلاحی Wangshubai، گنبد، نوید، توس، اینیا، کاوه، مغان۱، شیرودی، چمران، البرز، Entry 520، MS-84-13، WS-86-14، الموت، آرتا، الوند، شیراز، کویر، آزادی، مارون، N-86-3، کرج-۱، نیشابور، و مرودشت ممکن است واجد آلل موثر مقاومت *Sr2* باشند (Mohammadi *et al.*, 2013). البته باید توجه داشت که نشانگر gwm533 برای ردیابی ژن *Sr2* مناسب نمی‌باشد، زیرا کاملاً با این ژن پیوسته نیست.

آزمون ژنتیکی جایگاه ژنی *Sr24/Lr24*

ژن مقاومت به زنگ سیاه *Sr24* مقاومت اختصاصی و تک ژنی به زنگ سیاه در مرحله گیاهچه‌ای را کد می‌کند. این ژن بر روی بازوی بزرگ کروموزوم 3D قرار دارد (Smith *et al.*, 1968). منشاء این ژن از گونه *Agropyron elongatum* است که دارای پیوستگی بالایی با ژن *Lr24* می‌باشد. با کشف ژن مقاومت به زنگ سیاه *Sr24* عقیده بر این بود که این ژن توانایی بروز مقاومت در برابر تعداد زیادی از ایزوله‌های زنگ سیاه را دارد، ولی با ظهور نژادهای جدید همچون Ug99 (TTKSK) مقاومت آن شکسته شد (Mago *et al.*, 2010). البته ژن *Sr24* در واریته گندم دیگری به نام Amigo بر روی کروموزوم 1BS نیز مشاهده شد که منشاء آن یک جابجایی از چاودار می‌باشد. نشانگرهای مختلفی برای آزمون ژنتیکی این ژن معرفی شده است. در این پژوهش از نشانگر مولکولی STS بنام SR24#50 استفاده شده که محصول PCR این نشانگر در صورت وجود ژن مقاومت قطعه‌ای به اندازه ۲۰۰bp را روی ژل آگارز ۱/۵٪ نشان می‌دهد، ولی در نمونه-های فاقد این ژن مقاومت محصول PCR تکثیر نمی‌گردد. آزمون ژنتیکی حضور و یا عدم حضور ژن *Sr24* در لاین‌های مورد بررسی حاکی از آن بود که در هیچ‌کدام از این لاین‌ها ژن مقاومت *Sr24* وجود ندارد. Mohammadi و همکاران (۲۰۱۳) نیز در تحقیقات خود بیان داشتند که در هیچکدام از ارقام و لاین‌های ایرانی این ژن دیده نشده است (Mohammadi *et al.*, 2013).

آزمون ژنتیکی برای ژن *Sr26*

ژن مقاومت به زنگ سیاه *Sr26* روی کروموزوم 6A گندم قرار دارد. این ژن اولین بار از گونه *A. elongatum* به گندم هگزاپلوئید منتقل شده است (Kontt, 1961). این ژن که در سال ۱۹۷۱ با

رقم زراعی Eagle از استرالیا به برنامه به‌نژادی دنیا معرفی شد، از جمله معدود ژن‌هایی است که در برابر Ug99 (TTKSK) با قدرت بیماری‌زایی روی ژن *Sr31* و همچنین (TTKST) با بیماری‌زایی روی ژن *Sr24* توانایی بروز مقاومت را دارد (Liu *et al.*, 2009). جهت آزمون ژنتیکی برای این ژن از دو نشانگر غالب به صورت همزمان استفاده می‌شود که روشی مؤثر برای تشخیص ژنوتیپ‌های هموزیگوت از هتروزیگوت‌ها است. نشانگرهای مورد استفاده در این متد عبارتند از Sr26#43 و BE518379 که به ترتیب قطعاتی به اندازه ۲۰۷bp (حضور آلل مؤثر *Sr26*) و ۳۰۳bp (عدم حضور آلل مؤثر *Sr26*) را در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر می‌کنند (Liu *et al*, 2009). نتایج بررسی لاین‌های گندم مورد بررسی در کنار رقم زراعی Eagle نشان داد که هیچکدام از لاین‌ها حامل این ژن نبوده و آلل مؤثر *Sr26* فقط در رقم استرالیایی Eagle مشاهده شد.

آزمون ژنتیکی جایگاه ژنی *Sr31/Yr9/Lr26*

ژن *Sr31* مقاومت در مرحله گیاهچه‌ای را به صورت اختصاصی بروز می‌دهد و همچنین دارای پیوستگی با ژن‌های مقاومت در برابر زنگ زرد (*Yr9*) و مقاومت در برابر زنگ قهوه‌ای (*Lr26*) می‌باشد. این جایگاه ژنی روی کروموزوم 1BL گندم نان قرار دارد که به واسطه یک جابجایی کروموزومی از کروموزوم 1RS چاودار منشاء گرفته است (McIntosh *et al.*, 1995). بیش از سه دهه مزارع گندم دنیا به‌واسطه حضور ژن مقاومت *Sr31* در برابر بیماری زنگ سیاه مقاوم بودند، ولی بروز این بیماری در سال ۱۹۹۸ در اوگاندا و پس از آن در سال ۲۰۰۱ در کنیا توانست بر مقاومت طولانی مدت ژن *Sr31* که مقاومت موفقیت آمیزی را در برابر زنگ سیاه در دنیا از خود نشان داده بود، غلبه نماید. ژن *Sr31* همراه با ژن‌های *Lr26* و *Yr9* در یک جایگاه ژنی قرار دارد. برای تشخیص حضور آلل مؤثر *Sr31/Lr26/Yr9* از نشانگر مولکولی Iag95 استفاده گردید. این نشانگر STS با جایگاه ژنی مورد نظر دارای پیوستگی کاملی می‌باشد و حضور این ژن را با تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۱۱۰۰bp نشان می‌دهد. بررسی‌های انجام شده در این تحقیق با نشانگر Iag95 حاکی از آن بود که بلوک ژنی *Sr31/Lr26/Yr9* تنها در لاین WS-89-7 وجود دارد و در هیچ کدام از لاین‌های دیگر آلل مقاومت مشاهده نشد.

آزمون ژنتیکی جایگاه ژنی *Sr38/Yr17/Lr37*

جایگاه ژنی *Sr38/Yr17/Lr37* برای اولین بار به واریته VPM1 توسط انتقال یک قطعه کروموزومی به اندازه ۳۸–۲۵ سانتی‌مورگان از ژنوم 2N (*T. ventricosum*) به ژنوم 2A (*T. aestivum*) وارد شد و سپس این جایگاه ژنی به واریته‌های دیگر مانند Madsen و Thatcher منتقل گردید (McIntosh *et al.*, 1995; Seah *et al.*, 2000). اگرچه در تحقیقات بعدی مشاهده شد که ژن *Lr37* بسته به ژنوتیپ گیرنده دارای عکس‌العمل‌های متفاوتی است و مقاومت ژن‌های *Yr17* و *Lr37* نیز شکسته شده، ولی این جایگاه ژنی با مقاومت بالایی که در مرحله گیاهچه‌ای به جدایه‌های زیادی نشان می‌دهد، قابلیت مناسبی برای استفاده در برنامه‌های اصلاح در جهت مقاومت در برابر بیماری‌های زنگ گندم را دارد (Helgoera *et al.*, 2003). در آزمایش حاضر آزمون ژنتیکی حضور یا عدم حضور آلل مؤثر *Sr38/Yr17/Lr37* توسط نشانگر مولکولی VENTRIUP-Ln2 انجام شد. در بین لاین‌های مورد بررسی تنها لاین M-90-9 با تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۲۵۹bp حضور آلل مؤثر این بلوک ژنی را نشان داد و در سایر لاین‌ها این آلل مرتبط با مقاومت مشاهده نشد.

آزمون ژنتیکی جایگاه ژنی *Lr21*

ژن *Lr21* برای اولین بار از *Ae. tauschii* به کروموزوم 1DS گندم نان وارد شده است (Kerber and Dyck, 1969). این ژن باعث بروز مقاومت تخصصی و تک ژنی در مرحله گیاهچه‌ای در برابر *P. triticina* می‌شود. در این آزمایش از یک نشانگر

مولکولی STS به نام KSUD14 برای ردیابی این ژن در لاین‌های مورد بررسی استفاده شده است. این نشانگر مولکولی که دارای پیوستگی بالایی با ژن *Lr21* است، در صورت وجود آلل مقاومت به *Lr21* قطعه‌ای به اندازه ۶۶۹bp را تکثیر می‌کند. نتایج حاکی از آن بود که این ژن در هیچ‌کدام از لاین‌های مورد بررسی وجود ندارد.

آزمون ژنتیکی جایگاه ژنی *Lr29*

ژن *Lr29*، مقاومت به زنگ قهوه‌ای در مرحله گیاهچه‌ای را در گندم به صورت مقاومت تک‌ژنی و اختصاصی کد می‌کند. این ژن برای اولین بار از *Agropyron elongatum* به کروموزوم 7DS گندم نان منتقل شده است. متعاقباً ژن *Lr29* از طریق تلاقی برگشتی به لاین RL6080 (Tc*6/Lr29) وارد شد (Huerta-Espino, 1992). تحقیقات نشان داده که ارقام دارای این ژن مقاومت به صورت معنی‌داری دارای پروتئین دانه بالایی هستند و همچنین بررسی‌های انجام شده حاکی از آن است که هیچ‌گونه اثر نامطلوبی مانند کاهش کیفیت آرد و یا کاهش عملکرد دانه مرتبط با این جایگاه ژنی مقاومت به زنگ قهوه‌ای مشاهده نشده است (McIntosh *et al.*, 1995). در این آزمایش از یک نشانگر مولکولی SCAR (Lr29F24 and Lr29R24) برای ردیابی این ژن در لاین‌های مورد بررسی استفاده شد. این نشانگر مولکولی کاملا با ژن *Lr29* پیوسته بوده و در صورت وجود این ژن، قطعه‌ای به اندازه ۹۰۰bp روی ژل آگارز ۱/۲ درصد مشاهده می‌شود. نتایج آزمون ژنتیکی این جایگاه ژنی در پژوهش حاضر نشان داد که ژن *Lr29* در هیچ یک از لاین‌های مورد آزمایش وجود ندارد.

آزمون ژنتیکی جایگاه ژنی *SrCad*

این ژن برای اولین بار توسط Hiebert و همکاران (۲۰۱۰) در واریته گندم بهاره کانادایی AC Cadillac گزارش شد. ژن SrCad مقاومت اختصاصی در مرحله گیاهچه‌ای نسبت به *P. graminis* f. sp. *tritici* نژاد UG99 را سبب می‌شود. محل این ژن بر روی کروموزوم 6DS نقشه‌یابی شده است (Hiebert *et al.*, 2010). نشانگر مولکولی FSD-RSA نزدیک‌ترین نشانگر مولکولی است که برای ردیابی این ژن توصیه می‌شود. این نشانگر که در تحقیق حاضر نیز مورد استفاده قرار گرفته با فاصله تقریباً ۱/۶cM از ژن *SrCad* واقع شده است. پس از انجام واکنش PCR در صورت وجود آلل مؤثر برای ژن مذکور قطعه‌ای به اندازه ۲۷۵bp روی ژل آگارز ۱/۵ درصد مشاهده می‌شود. نتایج این آزمایش بیانگر این بود که ژن *SrCad* در هیچ‌یک از لاین‌های در دست معرفی بررسی شده وجود ندارد. Mohammadi و همکاران (۲۰۱۳) نیز در تحقیقات خود بیان داشتند که در هیچکدام از ارقام و لاین‌های ایرانی این ژن دیده نشده است.

ردیابی و انتقال ژن‌های جدید مقاومت در برابر بیماری‌های زنگ به ارقام زراعی گندم و همچنین هرمی نمودن ژن‌های مقاومت در ژرم‌پلاسم سازگار همواره یک راهکار موفق در جهت کنترل نژادهای نوظهور قارچ به شمار می‌رود. تکنیک‌های مولکولی یک ابزار دقیق در دست به‌نژادگران بوده که با کمک آن‌ها می‌توانند وجود و انتقال ژن‌های مقاومت در نتاج حاصل از تلاقی‌ها را ردیابی نمایند. نتایج مربوط به بررسی حضور و یا عدم حضور ژن‌های مقاومت در مرحله گیاه کامل و ژن‌های مقاومت در مرحله گیاهچه‌ای در ارقام در دست معرفی در تحقیق حاضر می‌تواند به عنوان ابزاری با ارزش توسط اصلاح‌گران در جهت هدفمند کردن تلاقی‌ها و ایجاد مقاومت پایدار در ارقام اصلاح شده مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر بخاطر فراهم نمودن امکانات انجام این پروژه (۹۲۲۲۷-۰۳-۰۳-۲) تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Abdel Hak TM, EL-Sherif NA, Bassiouny AA, Shafik II, EL-Dauadi Y (1980) Control of wheat leaf rust by systemic fungicides. In: Proceedings of the Fifth European and Mediterranean Cereal Rusts Conference, Bari, Italy.

Dakori A, Brent D, Callum M, Andrzej Z, Cloutier S (2010) Fine-mapping of the leaf rust *Lr34* locus in *Triticum aestivum* (L.) and characterization of large germplasm collections support the ABC transporter as essential for gene function. Theor. Appl. Genet. 121: 373–384.

Dyck PL (1987) The association of a gene for leaf rust resistance with the chromosome 7D suppressor of stem rust resistance in common wheat. Genome 29: 467–469.

Helguera M, Khan IA, Kolmer J, Lijavetzky D, Zhong-qi L, Dubcovsky J (2003) PCR assays for the *Lr37-Yr17- Sr38* cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. Crop Sci. 43: 1839-1847.

Hiebert CW, Thomas JB, McCallum BD, Humphreys DG, DePauw RM, Hayden MJ, Mago R, Schnippenkoetter W and Spielmeyer W (2010) An introgression on wheat chromosome 4DL in RL6077 (Thatcher*6/PI 250413) confers adult plant resistance to stripe rust and leaf rust (*Lr67*). Theor. Appl. Genet. 121:1083–1091.

Huerta-Espino J (1992) Analysis of wheat leaf rust and stem rust virulence on a worldwide basis**.** PhD Thesis, University of Minnesota, USA.

Hussain M, Hassan SF, Kirmani MA (1980) Virulence in *Puccenia recondita* f.sp. *tritici* in Pakistan during 1978 and 1979. In: Proceedings of the Fifth European European and Mediterranean Cereal Rusts Conference. Bari, Italy.

Kerber ER, Dyck PL (1969) Inheritance in hexaploid wheat of leaf rust resistance and other characters derived from Aegilops squarrosa. Can. J. Genet. and Cytol. 11:639-647.

Knott DR (1961) The inheritance of rust resistance. VI. The transfer of stem rust resistance from *Agropyron elongatum* to common wheat. Can. J. Plant. Sci. 41: 109-123.

Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeyer W, Singh RP, Huerta EJ, McFadden H, Bossolini E, Selter LL, Keller B (2009) A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. Science 323: 1360-1363.

Lagudah ES, Krattinger SG, Herrera-Foessel S, Singh RP, Huerta-Espino J, Spielmeyer W, Brown-Guedira G, Selter LL, Keller B (2009) Gene-specific markers for the wheat gene *Lr34/Yr18/Pm38* which confers resistance to multiple fungal pathogens. Theor. Appl. Genet. 119:889–898.

Lillemo M1, Asalf B, Singh RP, Huerta-Espino J, Chen XM, He ZH, Bjørnstad A (2008) The adult plant rust resistance loci Lr34/Yr18 and Lr46/Yr29 are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar. Theor. Appl. Genet. 116:1155-66.

Liu S, Yu L, Singh RP, Jin Y, Sorrells ME, Anderson JA (2009) Diagnostic and co-dominant PCR markers for wheat stem rust resistance genes *Sr25* and *Sr26*. Theor. Appl. Genet. 120: 691-697.

Mago R, Brown-Guedira G, Dreisigacker S, Breen J, Jin Y, Singh R, Appels R, Lagudah ES, Ellis J, Spielmeyer W (2010) An accurate DNA marker assay for stem rust resistance gene. Theor. Appl. Genet. 122: 735-744.

McIntosh RA, Wellings CR, Park RF. (1995) Wheat Rusts, an Atlas of Resistance Genes. CSIRO, Melbourne, Australia.

Mohammadi M, Torkamaneh D, Patpour

M (2013) Seedling stage resistance of Iranian breed wheat germplasm to race Ug99 of *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*. Plant Dis. 97: 387-392.

Nazari K, Mafi M, Yahyaoui A, Singh RP, Park RF (2009) Detection of wheat stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) race TTKSK (Ug99) in Iran. Plant Dis. 93: 317.

Saghai-Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard, RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 8014-8019.

Seah S, Spielmeyer W, Jahier J, Sivasithamparam K, Lagudah ES (2000) Resistance gene analogs within an introgressed chromosomal segment derived from *Triticum ventricosum* that confers resistance to nematode and rust pathogens in wheat. Mol. Plant-Microbe Interact. 13: 334-341.

Singh RP, Huerta-Espino J, Pfeiffer W. Figueroa-Lopez P (2004) Occurrence and impact of a new leaf rust race on durum wheat in northwestern Mexico from 2001 to 2003. *Plant Dis.* 88: 703–708.

Singh RP (1992) Genetic association of leaf rust resistance gene *Lr34* with adult plant resistance to stripe rust in bread wheat. Phytopathology 82: 835–838.

Singh RP, Mujeeb-Kazi A and Huerta-Espino J (1998) *Lr46*: A gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat. Phytopathology, 88 (9): 890-894.

Smith EL, Schlehuber AM, Young HC Jr, Edwards LH (1968) Registration of agent wheat. Crop Sci. 8: 511-512.

Spielmeyer W, McIntosh RA, Kolmer J, Lagudah ES (2005) Powdery mildew resistance and *Lr34/Yr18* genes for durable resistance to leaf and stripe rust co-segregate at a locus on the short arm of chromosome 7D of wheat. Theor. Appl. Genet. 11: 731–735.

Spielmeyer W, Sharp PJ, Lagudah ES (2003) Identification and validation of markers linked to broadspectrum stem rust resistance gene *Sr2* in wheat (*Triticum aestivum* L.) Crop Sci. 43: 333-336.

Torabi M, Mardoukhi V, Nazari K, Afshari F, Forootan AR, Ramai MA, Golzar H, Kashani AS (1995) Effectiveness of wheat yellow rust resistance genes in different parts of Iran. Cereal Rusts Powd. Mild. Bull. 23: 9-12.

William M, Singh R, Huerta J, Ortiz I, Hoisington D (2003) Molecular marker mapping of leaf rust resistance gene *Lr46* and its association with strip rust resistance gene *Yr29* in wheat. Genet. Resist. 93: 153-159.