بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۷ / شماره ۲ / سال ۱۴۰۰: ۱۰۹-۱۲۶ DOI: 10.22034/ijpp.2021.530981.355

CC BY

مقاله پژوهشی

ارزیابی فنوتیپی و مولکولی مقاومت به بیماری زنگ سیاه در برخی از ارقام تجاری و لاین‌های امیدبخش گندم

علی عمرانی[1*]، رامین روح‌پرور[2,3]، سعید اهری‌زاد[4]، منوچهر خدارحمی[2] و محمود تورچی[4]

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۷)

چکیده

بیماری‌های قارچی از عوامل عمده‌ی کاهش محصول و افزایش هزینه‌های تولید گندم به‌شمار می‌روند. زنگ ساقه یا سیاه با عامل (*Pgt*) *Puccinia graminis f. sp. tritici*، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی گندم در جهان می‌باشد. شناسایی منابع مقاومت جدید به زنگ سیاه و تعیین ژن‌های مقاومت موجود در آن‌ها، از ضروریات تولید ارقام مقاوم و ایجاد مقاومت پایدار به‌عنوان مهم‌ترین روش کنترل این بیماری محسوب می‌شود. به‌منظور شناسایی منابع جدید مقاومت گیاهچه‌ای نسبت به بیماری زنگ سیاه، الگوی بیماری‌زایی هشت جدایه‌ی مختلف *Pgt* بر روی ۲۷ رقم تجاری و لاین امیدبخش گندم حاصل از برنامه‌های ملی به‌نژادی کشور در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار بررسی شد. ردیابی مولکولی مکان‌های ژنی *Sr25/Lr19*، *Sr26*، *Sr36* و *Sr38/Lr37/Yr17* که از جمله ژن‌های موثر القای مقاومت گیاهچه‌ای به زنگ سیاه می‌باشند، با استفاده از نشانگرهای مولکولی پیوسته و مرتبط در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه انجام یافت. نتایج بررسی-های فنوتیپی نشان داد که لاین‌های *S-83-4*، *S-84-14*، *SEP-49* و *SEP-59* نسبت به تمامی نژادهای مورد مطالعه مقاومت گیاهچه‌ای قابل قبولی داشتند. داده‌های حاصل از آزمایش‌های مولکولی حاکی از آن بود که مکان ژنی *Sr25/Lr19* در لاین *SEP-58* و رقم مهرگان، و مکان ژنی *Sr38/Lr37/Yr17* در رقم سارنگ و لاین‌های *N-92-10*، *N-92-12* و *M-91-10* وجود داشته و ژن‌های *Sr26* و *Sr36* در هیچ‌کدام از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شناسایی نشدند. براساس نتایج به دست آمده از این پژوهش و با استفاده از ژنوتیپ‌های شناسایی شده حامل ژن-های مقاومت به‌عنوان والد بخشنده در برنامه‌های به‌نژادی گندم برای مقاومت به زنگ سیاه به‌ویژه نژادهای غالب بیمارگر و گروه نژادی *Ug99*، می‌توان فراوانی حضور ژن‌های موثر مقاومت در ارقام جدید اصلاح شده را افزایش داد.

کلیدواژه: زنگ ساقه، کاهش محصول، منابع مقاومت، قارچ *Puccinia graminis f. sp. tritici*

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ali_omrani90@yahoo.com

۱. استادیار پژوهش، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل (مغان)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مغان، ایران.

۲- استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۳- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان‌شرقی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران.

٤- استادان، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

CC BY

Research Article

Evaluation of Phenotypic and Molecular Resistance to Stem Rust Disease in Wheat Commercial Cultivars and Elite Lines

A. Omrani[1]*, R. Roohparvar[2,3], S. Aharizad[4], M. Khodarahmi[2], and M. Toorchi[4]

(Received: 10.6.2021; Accepted: 29.8.2021)

Abstract

Fungal diseases are considered as main causes of yield loss and increased costs in wheat production. Stem or black rust caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (*Pgt*), is a devastating fungal disease of wheat, worldwide. Identification of new stem rust resistance sources, and the involved genes are required to achieve resistant cultivars and durable resistance as the most efficient control method of wheat stem rust. In order to identify new seedling resistance sources, virulence pattern of eight *Pgt* isolates was studied on 27 wheat commercial cultivars and elite lines of national breeding programs in a randomized block design with three replications. Furthermore, the rust resistance loci *Sr25/Lr19*, *Sr26*, *Sr36* and *Sr38/Lr37/Yr17* were tracked as effective genes involved in wheat seedling resistance to stem rust using the linked molecular markers. Phenotypic data confirmed acceptable levels of seedling resistance to all tested *Pgt* races in the wheat lines S-83-4, S-84-14, SEP-49 and SEP-59. Based on the molecular results, *Sr25/Lr19* locus was identified in SEP-58 and cultivar Mehregan, while *Sr38/Lr37/Yr17* locus was found in the cultivar Sarang, and the lines N-92-10, N-92-12 and M-91-10. *Sr26* and *Sr36* were not identified in genotypes tested. Frequency of effective resistance genes in new wheat cultivars could be increased using the resistant genotypes identified in this research for stem rust resistance particularly to Ug99 race group and also to Iranian predominant *Pgt* races, as the donor parent in wheat breeding programs.

Keywords: Black rust, Yield loss, Resistance sources, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*

* Corresponding author's E-mail: ali_omrani90@yahoo.com

1. Assist. Prof., Crop and Horticultural Science Research Department, Ardabil Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Moghan, Iran.
2. Assist. Prof., Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
3. Assist. Prof., Crop and Horticultural Science Research Department, East Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Tabriz, Iran.
4. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

مقدمه

تولید سالیانه‌ی گندم (*Triticum aestivum* L.) به‌عنوان مهم‌ترین گیاه زراعی در تامین نیازهای غذایی جمعیت انسانی به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه، تحت تاثیر انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار دارد. از میان تنش‌های زیستی، زنگ‌های گندم (زنگ زرد، سیاه و قهوه‌ای) تقریبا با ظهور در تمام مناطق زیرکشت، گسترده‌ترین و خسارت‌زاترین بیماری‌های این محصول به‌شمار می‌روند. بیماری زنگ ساقه یا زنگ سیاه گندم (stem rust) با عامل قارچی *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* به‌ویژه در مناطقی که در تابستان دمای هوا به‌طور مرتب از ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بالاتر می‌رود، خسارت‌زاترین بیماری گندم می‌باشد (Chen *et al*., 2015). در حال حاضر زنگ سیاه کشت‌زارهای گندم در آفریقا، خاورمیانه، مناطق جنوب و جنوب شرق آسیا، استرالیا، اروپا و آمریکای شمالی و جنوبی را تهدید می‌نماید (Singh *et al*., 2015).

با به‌کارگیری ژن‌های مقاومت موثر نسبت به زنگ سیاه از جمله *Sr31* تصور می‌شد که این بیماری در حال ریشه‌کن شدن می‌باشد، ولی ظهور و گسترش نژاد TTKSK (Ug99) و اکثر واریانت‌های آن که بر روی *Sr31* پرآزاری (توان بیماری‌زایی: virulence) داشتند، تولید گندم در مناطق مختلف جهان را مجددا با تهدید بسیار جدی مواجه کرد (Singh *et al*., 2008). نژاد Ug99 پس از اوگاندا (سال ۱۹۹۹) در سال ۲۰۰۲ از کنیا و در سال ۲۰۰۳ از اتیوپی و سودان گزارش شده و در سال ۲۰۰۶ به یمن منتقل گردید (Singh *et al*., 2015). در ایران نژاد TTKSK (Ug99) در سال ۱۳۸۶ (۲۰۰۷ میلادی) از مناطق بروجرد و همدان (Nazari *et al*., 2009) و در سال ۱۳۸۸ از مناطق اهواز و دشت آزادگان استان خوزستان، در سال ۱۳۹۰ از بروجرد استان لرستان و در سال ۱۳۹۲ از کلاردشت استان مازندران و در سال ۱۳۹۵ از منطقه هشترود استان آذربایجان شرقی گزارش گردید (Patpour, 2013; Afshari *et al*., 2015; Omrani and Roohparvar, 2021b).

استفاده از مقاومت ژنتیکی شامل دو نوع مقاومت عمودی و افقی راهبرد اصلی مدیریت زنگ‌ها به‌شمار می‌رود که از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه‌ترین و از لحاظ زیست محیطی امن‌ترین روش کنترل این بیماری‌ها می‌باشد (McCallum *et al*. 2016). پیدا کردن ژن‌های جدید مقاومت به زنگ‌ها و انتقال آن‌ها به ارقام زراعی گندم، و هرمی نمودن این ژن‌ها در ژرم‌پلاسم سازگار به‌منظور تولید ارقام مقاوم پایدار از دیرباز راهکار اصلی برای کنترل نژادهای جدید زنگ‌ها بوده و انتظار می‌رود در آینده نیز راهکار اصلی مبارزه با این بیماری‌ها باشد (Yang *et al*., 2015). ژن‌های مقاومت *Sr2*، *Sr24*، *Sr26*، *Sr31*، *Sr36* و *Sr38* که در طول سالیان متمادی مهم‌ترین ژن‌های عامل پایداری مقاومت گندم به زنگ سیاه در جهان بودند، همگی از چاودار زراعی یا خویشاوندان وحشی گندم به ارقام زراعی منتقل شده‌اند (Singh *et al*., 2008). تعداد ژن‌های مقاومت به نژاد Ug99 و واریانت‌های آن محدود بوده و این ژن‌ها در ساختار ژنتیکی اغلب ارقام رایج در مناطق مختلف جهان وجود ندارند. از جمله این ژن‌ها که توانسته‌اند مقاومت مناسبی را نسبت به نژاد Ug99 یا واریانت‌های آن نشان دهند، می‌توان از *Sr2*، *Sr13*، *Sr21*، *Sr22*، *Sr24*، *Sr25*، *Sr26*، *Sr28*، *Sr32*، *Sr33*، *Sr35*، *Sr36*، *Sr38*، *Sr39*، *Sr43*، *Sr44*، *Sr45*، *Sr47*، *Sr49*، *Sr50*، *Sr52*، *Sr55*، *Sr56*، *Sr57*، *SrCad* و *SrAmigo* نام برد (Anonymous, 2021).

بررسی‌های بین‌المللی اخیر نشان می‌دهد که علاوه بر

نژاد Ug99 و واریانت‌های آن، نژادهای دیگری از عامل بیماری زنگ سیاه در حال گسترش می‌باشند که دارای الگوی پرآزاری متفاوت بوده و خسارت‌های فراوانی نیز به‌وجود آورده‌اند (Singh *et al*., 2015). به‌عنوان مثال نژاد TKTTF در سال ۲۰۱٤ در جنوب اتیوپی (Olivera *et al*., 2015) و نژاد TTTTF در سال ۲۰۱٦ در سیسیل ایتالیا (Bhattacharya, 2017) همه‌گیری‌های شدیدی بوجود آوردند. نژادهای TKTTF و TTTTF از ایران نیز گزارش شده‌اند (Omrani and Roohparvar, 2020; Patpour, 2013). اخیرا ظهور نژاد جدید TTRTF و خسارت‌های ناشی از آن به محصول گندم در چند کشور گزارش شده است (Patpour *et al*., 2020). در سال‌های اخیر این نژاد در کشور نیز مشاهده شده است (Omrani and Roohparvar, 2021a).

استفاده از نشانگرهای مولکولی برای شناسایی حضور ژن‌های موثر مقاومت در ژنوتیپ‌های گندم، ابزار مناسبی در دست به‌نژادگران می‌باشد که با استفاده از آن می‌توانند تلاقی‌های هدفمندی را در جهت رسیدن به مقاومت پایدار ارقام در مقابل بیماری‌ها به‌ویژه زنگ‌ها پایه‌ریزی کرده، و افراد جمعیت را در کلیه مراحل هرمی کردن ژن‌ها و تلاقی‌های برگشتی هوشمندانه‌تر انتخاب نمایند (Francia *et al*., 2005).

نتایج غربال ۱۱۷ رقم پاکستانی گندم از لحاظ داشتن مکان‌های ژنی *Sr2*، *Sr6*، *Sr22*، *Sr24*، *Sr25*، *Sr26*، *Sr31* و *Sr38* با استفاده از نشانگرهای مولکولی پیوسته نشان داد که مکان‌های ژنی *Sr22*، *Sr24*، *Sr25* و *Sr26* در هیچ‌یک از ارقام مورد بررسی وجود نداشت، در حالی که مکان ژنی *Sr2* در ۹ درصد ارقام، *Sr6* در ۱۱ درصد، *Sr31* در ۳۵ و مکان ژنی *Sr38* در ۹ درصد از ارقام مورد بررسی شناسایی شد (Ejaz *et al*., 2012).

ارزیابی واکنش گیاهچه‌ای ۷۵ رقم گندم چینی نسبت به شش نژاد *Pgt*، و بررسی حضور مکان‌های ژنی *Sr2*، *Sr24*، *Sr25*، *Sr26*، *Sr31* و *Sr38* با استفاده از نشانگرهای مولکولی پیوسته نشان داد که ۳۸ رقم نسبت به همه‌ی نژادها واکنش مقاومت گیاهچه‌ای داشتند، ضمن این که ۱۳ رقم دارای مکان ژنی *Sr2*، ۲۵ رقم حامل *Sr31*؛ و نه رقم دارای مکان ژنی *Sr38* بودند. مکان‌های ژنی *Sr24*، *Sr25* و *Sr26* در هیچ یک از ارقام مورد بررسی شناسایی نشد (Xu *et al*., 2017).

با توجه به تغییرپذیری بالای عامل بیماری، شناسایی منابع مقاومت جدید نسبت به نژادهای موجود و نژادهای نوظهور بایستی به‌طور دایم انجام گیرد. در تحقیق حاضر به‌منظور بررسی مقاومت به زنگ سیاه و شناسایی منابع جدید مقاومت، ۲۷ ژنوتیپ گندم شامل ارقام تجاری و لاین‌های امیدبخش حاصل از برنامه‌های ملی به‌نژادی کشور مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین ردیابی مولکولی چهار مکان ژنی *Sr25/Lr19*، *Sr26*، *Sr36* و *Sr38/Lr37/Yr17* در ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی پیوسته و مرتبط بررسی گردید. به‌کارگیری نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های مقاومت ضمن تعیین تنوع ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها و تایید نتایج حاصل از بررسی‌های تنوع فنوتیپی در گلخانه، می‌تواند موجب تسریع شناسایی منابع مقاومت و استفاده از آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی به‌منظور تجمع ژن‌های مقاومت در ژنوتیپ‌های مطلوب گردد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده و ارزیابی مقاومت گیاهچه‌ای ژنوتیپ‌های گندم در شرایط گلخانه‌ای

در این مطالعه واکنش مقاومت گیاهچه‌ای ۲۷ رقم و

جدول ۱. ارقام تجاری و لاین‌های امیدبخش گندم

Table 1. Wheat commercial cultivars and elite lines

No.	Cultivar/ Line*	Pedigree/ Comment
1	Tirgan	PFAU/MILAN/5/CHEN/AEGILOPS SQUARROSA (TAUS)//BCN/3/VEE#7/BOW/4/ PASTOR
2	Sarang	PRL/2*PASTOR/4/CHOIX/STAR/3/HE1/3*CNO79//2*SERI
3	Zarineh	Omid/4/Bb/Kal//Ald/3/Y50E/Kal*3//Emu"s"/5/Zrn/6/Zrn/Shiroodi
4	Mehregan	OASIS/SKAUZ//4*BCN/3/2*PASTOR
5	Euclide	-
6	N-90-12	BABAX/LR42//BABAX*2/3/VIVITSI
7	N-90-14	SHAAN 229/3/SHA3/SERI//G.C.W 1/SERI
8	N-91-15	NANJING2149/KAUZ/4/JUP/ALD"S"//KIT"S"/3/VEE"S"/5/SHA7//HAHN"S"*2/PRL"S"
9	Arman	VOROBEY
10	N-92-10	KLCQ/ER2000//WBLL1
11	N-92-12	SHA3/CBRD//PRL/2*PASTOR
12	Araz	PBW343/TONI//TROST/3/SOVA
13	S-83-4	F60314.76/MRL//CNO79/3/KA/NAC/4/STAR
14	S-84-14	PASTOR/3/KAUZ*2/OPATA//KAUZ
15	S-91-6	Alvand//Aldan"s"/IAS58/3 /Vee/Nac
16	M-91-6	Tui//CMH 76-252/Pvn "s"/3/Flt
17	M-91-10	PRL/2*PASTOR/4/CHOIX/STAR/3/HE1/3*CNO79//2*SERI
18	C-87-11	Basswood/Mv17
19	C-87-12	Basswood/MV17
20	C-87-13	Bhr*5/Aga//Sni/3/Trk13/4/Gaspard
21	C-88-13	Qds/4/Anza/3/Pi/Nar//Hys/5/Vee/Nac/6/Gascogne/7/Zrn
22	C-89-6	Fdo 2062
23	C-89-7	Zrn*2/Gaspard
24	C-89-15	Fdo 4085
25	SEP-49	CROC_1/AE.SQUARROSA (205)/KAUZ
26	SEP-58	RABI//GS/CRA/3/AE.SQUARROSA (190)
27	SEP-59	68.111/RGB-U//WARD/3/AE.SQUARROSA (328)
28	Morocco	Susceptible control

*: این ژنوتیپ‌ها براساس خصوصیات زراعی (عملکرد دانه، پایداری عملکرد، زودرسی، تحمل به خشکی آخر فصل)، کیفیت نانوایی و مقاومت به بیماری‌ها از آزمایش‌های سازگاری برنامه‌های به‌نژادی چهار اقلیم کشور (بخش تحقیقات غلات، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال وبذر) جهت بررسی در این پژوهش به‌عنوان ژنوتیپ‌های برتر و منابع مقاومت به بیماری‌ها انتخاب شدند.

لاین امیدبخش گندم، تولید شده در بخش تحقیقات غلات (موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج) مربوط به چهار اقلیم گرم و مرطوب شمال، گرم و خشک جنوب، معتدل و سرد کشور نسبت به هشت جدایه‌ی قارچ عامل بیماری در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه به‌همراه شجره‌ی ارقام امیدبخش در جدول ۱ نشان داده شده است. اطلاعات مربوط به جدایه‌های قارچ *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* مورد استفاده در این پژوهش شامل نژاد، محل جمع‌آوری، و کارایی هر یک از ژن‌های مقاومت *Sr* در برابر این جدایه‌ها به‌صورت الگوی ژنی غیرموثر/موثر در جدول ۲ ارایه شده است. صفات تیپ آلودگی و دوره کمون به‌عنوان اجزای مقاومت گیاهچه‌ای برای غربال کردن ژنوتیپ‌های گندم در شرایط گلخانه‌ای اندازه‌گیری گردید.

کاشت ژنوتیپ‌ها در مخلوط خاک مناسب مزرعه و پیت‌ماس به نسبت ۲:۱ در داخل گلدان‌ها براساس طرح آزمایشی مذکور انجام شده و گیاهچه‌های هفت روزه با

جدول ۲. الگوی غیرموثر/موثر ژن‌های مقاومت *Sr* برای نژادهای قارچ *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* مورد استفاده در ارزیابی مقاومت ارقام و لاین‌های امیدبخش گندم و مشخصات محل جمع‌آوری جدایه‌ها

Table 2. Ineffective/effective pattern of *Sr* resistance genes to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* races used for resistance evaluation of wheat cultivars and elite lines

Isolate	Race	Province	Region	Effective genes / Ineffective
94-1	TKTTF	Golestan	Gorgan	*Sr5, 6, 7b, 8a, 9a, 9b, 9d, 9e, 9g, 10, 13+17, 21, 30, 36, 38, Tmp, Mcn* / ***Sr11, 24, 31***
94-8	TTTTF	Lorestan	Broujerd	*Sr5, 6, 7b, 8a, 9a, 9b, 9d, 9e, 9g, 10, 11, 13+17, 21, 30, 36, 38, Tmp, Mcn* / ***Sr24, 31***
94-15	PTRTF	Mazandaran	Kelardasht	*Sr5, 6, 7b, 8a, 9a, 9b, 9d, 9e, 9g, 10, 11, 13+17, 36, 38, Tmp, Mcn* / ***Sr21, 24, 30, 31***
94-27	TKSTC	East Azarbaijan	Khosroshah-Ilkhichi	*Sr5, 6, 7b, 8a, 9a, 9b, 9d, 9e, 9g, 10, 21, 30, 36, Tmp, Mcn* / ***Sr11, 13+17, 24, 31, 38***
94-31	TTRTF	West Azarbaijan	Oshnavieh-Naghadeh	*Sr5, 6, 7b, 8a, 9a, 9b, 9d, 9e, 9g, 10, 11, 13+17, 21, 36, 38, Tmp, Mcn* / ***Sr24, 30, 31***
93-1	TKTTF	Golestan	Gorgan	*Sr5, 6, 7b, 8a, 9a, 9b, 9d, 9e, 9g, 10, 13+17, 21, 30, 36, 38, Tmp, Mcn* / ***Sr11, 24, 31***
93-12	TKTTF	Lorestan	Broujerd	*Sr5, 6, 7b, 8a, 9a, 9b, 9d, 9e, 9g, 10, 13+17, 21, 30, 36, 38, Tmp, Mcn* / ***Sr11, 24, 31***
93-45	TTTTF	Mazandaran	Kelardasht	*Sr5, 6, 7b, 8a, 9a, 9b, 9d, 9e, 9g, 10, 11, 13+17, 21, 30, 36, 38, Tmp, Mcn* / ***Sr24, 31***

زادمایه‌ی نژادهای قارچ مایه‌زنی شدند.

هر یک از جدایه‌های قارچ که قبلا جداسازی، خالص‌سازی، تک جوش و با مجموعه ژنوتیپ‌های افتراقی زنگ سیاه آمریکای شمالی (Jin *et al*., 2008) تعیین نژاد شده بودند، به‌طور جداگانه با استفاده از سوسپانسیون یوردینیوسپور خالص در روغن سالترول ۱۷۰ بر روی گیاهچه‌ها مایه‌زنی شدند. در تمام آزمایش‌های ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های گندم، ارقام و لاین‌های افتراقی زنگ سیاه به‌عنوان شاهد جهت تایید نژاد مورد استفاده قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری صفت دوره کمون یا نهان بیماری (مدت زمان بین مایه‌زنی تا ظهور اولین جوش‌های زنگ بر روی برگ‌ها) از حلقه‌های پلاستیکی رنگی متفاوت برای روزهای مختلف تا ۱٤ روز بعد از مایه‌زنی استفاده شد.

بررسی تیپ آلودگی ژنوتیپ‌ها ۱٤ روز پس از مایه‌زنی با یادداشت‌برداری از واکنش گیاهچه‌ها نسبت به نژادهای زنگ سیاه با استفاده از مقیاس تغییر یافته‌ی صفر تا چهار استاکمن و همکاران (Stakman *et al*., 1962) توسط مک‌اینتاش و همکاران (McIntosh *et al*., 1995) صورت گرفت. تجزیه واریانس تیپ‌آلودگی براساس این مقیاس و به صورت امتیازدهی و اختصاص مقادیر عددی ۱ تا ۱۱ برای گروه‌های فنوتیپی بیماری زنگ سیاه بر روی گندم انجام شد (جدول ۳).

ارزیابی مولکولی ارقام تجاری و لاین‌های امیدبخش گندم برای نشانگرهای پیوسته

به‌منظور ردیابی مولکولی ژن‌های مقاومت گیاهچه‌ای به

جدول ۳. نحوه امتیازدهی برای گروه‌های فنوتیپی بیماری زنگ سیاه بر روی میزبان گندم

Table 3. Scoring for phenotypic groups of stem rust on wheat host

Phenotypic groups	0, 0;, ;	;1	1	1+	2-	2C, 2	2+	3-	3	3+	4
Scoring	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

جدول ٤. مشخصات نشانگرهای مولکولی مرتبط با مکان‌های ژنی مقاومت به زنگ سیاه در ارقام و لاین‌های امیدبخش گندم

Table 4. Molecular markers linked to resistance loci of stem rust used in wheat cultivars and elite lines

Gene	Chromosomal location	Molecular markers	Forward/Reverse	PCR	Band size (bp)
Sr25/Lr19 *McIntosh, RA et al. 1977. Aust. J. Biol. Sci. 28:37-45*	7DL	*Gb*	Gb-F 5'- CAT CCT TGG GGA CCT C -3' Gb-R 5'- CCA GCT CGC ATA CAT CCA -3'	94◦C- 30sec 60◦C- 30sec 72◦C- 60 sec (40 cycles)	130
Sr26 *Knott, DR 1961. Can. J. Plant Sci. 41:109-123*	6AL/6Ae	*Sr26#43*	Sr26#43-F 5'- AAT CGT CCA CAT TGG CTT CT -3' Sr26#43-R 5'- CGC AAC AAA ATC ATG CAC TA -3'	94◦C- 30 sec 56◦C- 30sec 72◦C- 40 sec (30 cycles)	207
Sr26 *Knott, DR 1961. Can. J. Plant Sci. 41:109-123*	6AL/6Ae	BE518379	BE518379-F 5'- AGC CGC GAA ATC TAC TTT GA -3' BE518379-R 5'- TTA AAC GGA CAG AGC ACA CG -3'	94°C, 60 sec 60°C, 60 sec 72°C, 120 sec (35 cycles)	303
Sr36 *McIntosh, RA 1971. Z. Pflanzenzuchtung 66:240-248*	2BS	*Xgwm319*	gwm319F 5'- GGT TGC TGT ACA AGT GTT CAC G -3' gwm319R 5'- CGG GTG CTG TGT GTA ATG AC -3'	94◦C- 60 sec 61◦C- 60 sec 72◦C- 120 sec (45 cycles)	170
Sr38/Lr37/Yr17 *Bariana, HS and McIntosh, RA 1994. Euphytica 76:53-61*	2AS	VENTRIUP LN2	VENTRIUP 5'- AGG GGC TAC TGA CCA AGG CT-3' LN2 5'- TGC AGC TAC AGC AGT ATG TAC ACA AAA-3'	94◦C- 45 sec 65◦C- 30 sec 72◦C- 60 sec (45 cycles)	259

بیماری زنگ سیاه گندم ژنوتیپ‌های مورد مطالعه توسط چهار نشانگر مولکولی پیوسته با مکان‌های ژنی *Sr25/Lr19*، *Sr26*، *Sr36* و *Sr38/Lr37/Yr17* مورد بررسی قرار گرفتند. مشخصات هر یک از نشانگرهای مولکولی مورد استفاده در جدول ٤ ارایه شده است.

هر یک از ارقام و لاین‌های مورد بررسی به‌صورت جداگانه در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک مزرعه و پیت ماس به نسبت ۲:۱ کشت گردید، و استخراج DNA از برگ‌های جوان جدا شده در مرحله‌ی سه برگی (۲۰۰ میلی‌گرم برگ) با استفاده از روش CTAB انجام شد (Saghai-Maroof *et al.*, 1984). خصوصیات کیفی و کمی DNAی استخراج شده شامل شکستگی، وجود یا عدم وجود RNA، و غلظت با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز ۰/۸ درصد و اسپکتروفتومتری (Termo electron corporation) در طول موج ۲٦۰ نانومتر بررسی گردید. سپس غلظت نمونه‌های DNA برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر رسید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۵ میکرولیتر برای هر واکنش با استفاده از بافر PCR (1X)، آغازگرهای مورد نظر برای هر مکان ژنی (۲۰۰nM)، آنزیم تگ‌پلیمراز (یک واحد)، dNTPs به میزان ۰/۲ mM، $MgCl_2$ به‌میزان mM ۲ و DNA به‌میزان ng ۵۰ برای هر واکنش انجام شد. برنامه‌ی حرارتی PCR در دستگاه Bio Rad T100 به‌صورت یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹٤

درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه و مرحله‌ی بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه، و چرخه‌های همانندسازی شامل مراحل واسرشت‌سازی، اتصال و بسط نشانگرها در دما و مدت‌های مشخص بر اساس جدول ٤ تنظیم شد. پس از اتمام PCR، نمونه‌ها از دستگاه خارج شده و تا قبل از الکتروفورز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس محصولات حاصل از PCR توسط دستگاه الکتروفورز (Electrophoresis power supply EPS600) بر روی ژل آگاروز دو درصد حاوی بافر TBE 0.5X و ژل پلی‌آکریلامید شش درصد حاوی بافر TAE 0.5X با ولتاژ ۱۰۰ آمپر تفکیک شدند و ژل حاصل با استفاده از اتیدیوم بروماید به‌مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و توسط اشعه UV در دستگاه ژل داکیومنت (Uvitec Uvipro siloer) با استفاده از بسته نرم‌افزاری (Bio-Rad, München, Germany) مورد عکس‌برداری قرار گرفت. تجزیه و تحلیل، و نمره‌دهی آلل‌ها به‌صورت مقایسه با نشانگر وزنی (Mass ladder marker) و شاهد-های مثبت و منفی به‌صورت صفر (عدم وجود نوار) و یک (وجود نوار) انجام شد. در همه‌ی آزمایش‌ها رقم افتراقی حامل ژن مقاومت و رقم حساس موروکو به‌ترتیب به‌عنوان کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شد.

تجزیه‌های آماری و ژنتیکی

برای تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به ارزیابی مقاومت گیاهچه‌ای ژنوتیپ‌های گندم به‌علت انجام آزمایش‌ها در زمان‌های مختلف از تجزیه واریانس مرکب استفاده شد. برای انجام تجزیه واریانس، بررسی فرض‌های اساسی صورت گرفت، به این ترتیب که از آزمون‌های شاپیرو ویلک و کلموگراف اسمیرنوف به‌منظور بررسی نرمال بودن توزیع انحرافات برای صفات مورد مطالعه استفاده شد. توزیع خطاهای درون گروهی از روند خاصی پیروی نکرد، بنابراین فرض یکنواختی واریانس درون گروه‌ها صادق بود. آزمون نرمال بودن توزیع انحرافات داده‌های صفات انجام گرفت و داده‌ها با تبدیل جذری نرمال گردید. هر جدایه معادل محیط در تجزیه واریانس مرکب در نظر گرفته شد. برای تعیین روابط در پاسخ ژنوتیپ‌های گندم نسبت به نژادهای زنگ سیاه، با استفاده از اجزای مقاومت اندازه‌گیری شده از تجزیه خوشه‌ای به روش Ward استفاده شد. برای تعیین محل خط برش برای مشخص شدن گروه‌ها در تجزیه خوشه‌ای از رابطه $\sqrt{\frac{N}{2}}$ و براساس اهداف تحقیق استفاده گردید. برای انجام تجزیه واریانس مرکب طرح‌های آزمایشی از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۳، Excel نسخه ۲۰۱۳ و برای انجام تجزیه خوشه‌ای از نرم‌افزار SPSS نسخه ١٦ و برای آزمون نرمال بودن توزیع انحرافات از نرم‌افزار Minitab نسخه ١٦ استفاده شد.

نتایج و بحث

مقاومت ارقام تجاری و لاین‌های امیدبخش گندم نسبت به زنگ سیاه در مرحله‌ی گیاهچه‌ای

نتایج تجزیه واریانس مرکب صفات تیپ آلودگی و دوره‌ی کمون ارقام تجاری و لاین‌های امیدبخش گندم (جدول ٥) نشان داد که در بین ژنوتیپ‌ها تفاوت‌های ژنتیکی برای صفات مذکور وجود دارد. معنی‌دار شدن میانگین مربعات اثر متقابل ژنوتیپ × نژاد در سطح احتمال یک درصد، حاکی از آن بود که ژنوتیپ‌ها در مقابل نژادهای مورد مطالعه واکنش یکسان نداشته، و همچنین مقاومت اختصاصی نسبت به این نژادها وجود دارد. در جدول ٦ واکنش ارقام و لاین‌های امیدبخش نسبت به

جدول ۵. تجزیه واریانس مرکب برای صفات تیپ آلودگی و دوره‌ی کمون در ارقام تجاری و لاین‌های امیدبخش نسبت به نژادهای قارچ *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*

Table 5. Combined analysis of variance for the traits infection type and latency period in wheat commercial cultivars and elite lines to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* races

S.O.V	Df	Ms (IT*)	Ms (LP)
		IT	LP
Race	7	9.52**	11.16**
Error (1)	16	1.56	2.44
Genotype	27	15.18**	17.12**
Genotype× Race	189	11.89**	12.22**
Error (2)	432	2.41	2.18
CV%		9.31	8.19

*: IT, Infection type LP, Latency period

نژادهای قارچ *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* و مدت زمان دوره کمون بیماری در هر یک از این ژنوتیپ‌ها نشان داده شده است. تجزیه خوشه‌ای انجام شده به روش وارد (Ward) به‌منظور تعیین شباهت و فاصله بین ارقام و لاین‌های امیدبخش گندم برای صفات تیپ آلودگی و دوره کمون در پاسخ به نژادهای قارچ *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (شکل ۱)، ژنوتیپ‌های مورد بررسی را در سه گروه مقاوم، نیمه‌مقاوم تا نیمه‌حساس، و حساس قرار داد. ژنوتیپ‌های حساس با تیپ آلودگی ۹ تا ۱۱ (۳ تا ٤ براساس مقیاس صفر تا ٤) و دارای دوره کمون بین ۵ تا ۷ روز در مجموع ۵۰ درصد از کل ژنوتیپ‌ها را شامل بودند. ژنوتیپ‌های نیمه‌حساس تا نیمه‌مقاوم با تیپ آلودگی ٦ تا ۸ (۲ تا ۳- براساس مقیاس صفر تا ٤) و دارای دوره کمون بین ۸ تا ۱۰ روز، ۳٦ درصد از ژنوتیپ‌ها را به خود اختصاص دادند و ژنوتیپ‌های مقاوم با تیپ آلودگی صفر تا پنج (۰ تا ۲- براساس مقیاس صفر تا ٤) و دارای دوره کمون بین ۱۱ تا ۱٦ روز، ۱٤ درصد از کل ژنوتیپ‌ها را شامل بودند (لاین‌های S-83-4، S-84-14، SEP-49 و SEP-59). در ژنوتیپ‌های حساس ژن یا ژن‌های مقاومت موثری که بتوانند در برابر نژادهای مورد مطالعه عامل زنگ سیاه ایجاد مقاومت نمایند، وجود ندارد، لذا بالاترین تیپ آلودگی و کوتاه‌ترین دوره کمون برای این ژنوتیپ‌ها ثبت شد. ژنوتیپ‌های مقاوم دارای دوره کمون طولانی‌تری بودند که نشان می‌دهد بیمارگر (عامل بیماری) با داشتن رشد کندتر، چرخه‌ی زندگی خود را دیرتر کامل می‌نماید. بنابراین استفاده از ارقام مقاوم علاوه بر ایجاد مقاومت در برابر بیمارگر و جلوگیری از کاهش عملکرد محصول، سبب کاهش حجم یوردینیوسپور تولیدی به‌عنوان زادمایه یا مایه‌ی تلقیح قارچ عامل بیماری در دوره‌ی فعالیت خود در شرایط مزرعه‌ای شده و از این طریق گسترش آلودگی‌های ثانویه و همه‌گیری (اپیدمی) بیماری کنترل خواهد شد (Roelfs *et al*., 1992).

ردیابی مکان‌های ژنی مقاومت به زنگ سیاه با استفاده از نشانگرهای مولکولی

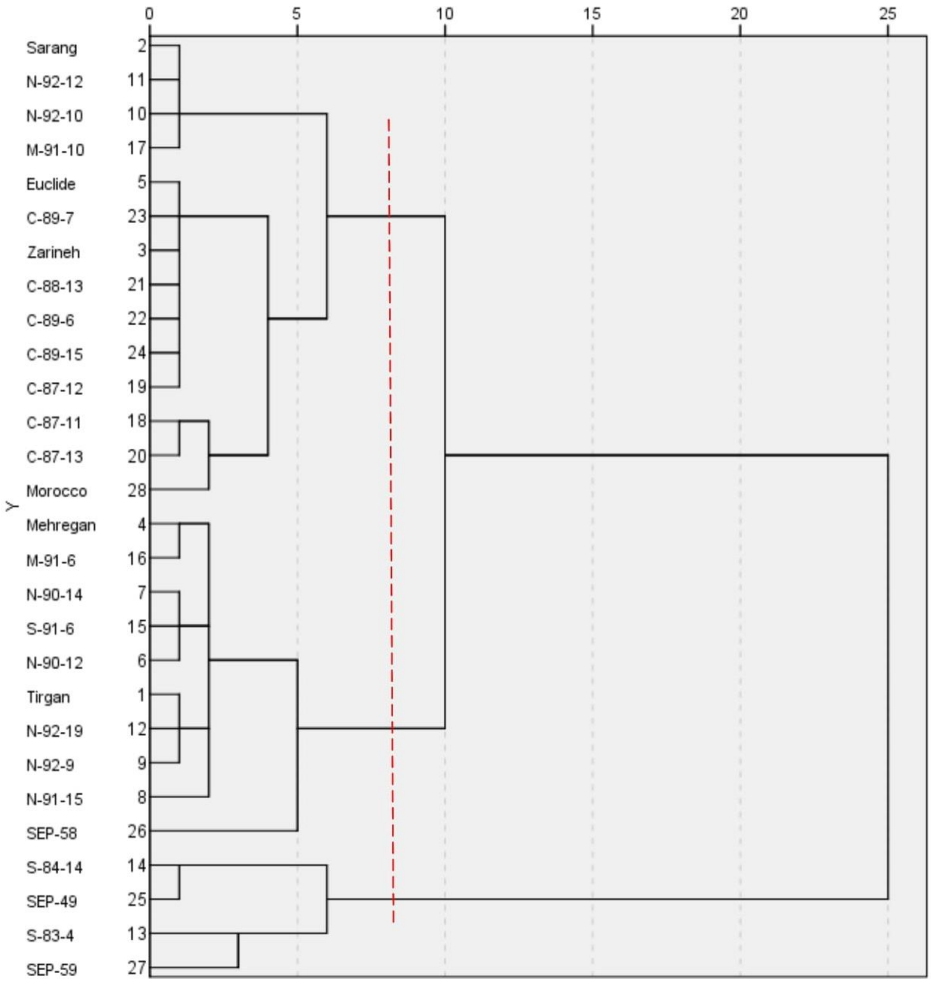
نژاد Ug99 در سال ۱۳۸٦ (۲۰۰۷ میلادی) از مناطق بروجرد و همدان (Nazari *et al*., 2009)، در سال ۱۳۸۸ از مناطق اهواز و دشت آزادگان استان خوزستان، در سال ۱۳۹۰ از بروجرد و در سال ۱۳۹۲ از کلاردشت استان مازندران گزارش گردید (Patpour, 2013; Afshari *et al*., 2015). به‌منظور ردیابی ژن‌های مقاومت به زنگ سیاه در ۲۷ رقم تجاری و لاین امیدبخش گندم، حضور یا عدم حضور مکان‌های ژنی *Sr25/Lr19*، *Sr26* و *Sr36* که از موثرترین ژن‌های مقاومت نسبت به نژاد Ug99 و برخی از واریانت‌های آن می‌باشند، و همچنین مکان ژنی *Sr38/Lr37/Yr17* که نسبت به برخی از نژادهای مهم موجود در کشور مانند نژادهای TTTTC، TKTTC و TTSTC (گزارش شده توسط پاتپور (Patpour, 2013)) و

جدول ۶. مقادیر عددی صفات تیپ آلودگی و دوره‌ی کمون در ارقام تجاری و لاین‌های امیدبخش گندم در برابر نژادهای قارچ *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*

Table 6. Values of the traits infection type and latency period in wheat commercial cultivars and elite lines to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* races

No.	Cultivar/ Line	Gorgan 1394		Broujerd 1394		Kelardasht 1394		Khosroshah-Ilkhichi 1394		Oshnavieh-Naghadeh 1394		Gorgan 1393		Broujerd 1393		Kelardasht 1393	
		TKTTF		TTTTF		PTRTF		TKSTC		TTRTF		TKTTF		TKTTF		TTTTF	
		IT	LP	IT	LP	IT	LP	IT	LP	IT	LP	IT	LP	IT	LP	IT	LP
1	Tirgan	7	9	7	9	6	9	6	10	7	9	8	8	8	8	8	8
2	Sarang	9	7	9	7	9	7	5	11	9	7	9	7	9	7	9	7
3	Zarineh	9	7	9	7	9	8	7	9	8	8	7	8	8	8	9	7
4	Mehregan	9	7	5	11	9	7	9	7	5	11	6	10	5	11	5	11
5	Euclide	9	7	9	7	8	8	8	8	7	9	7	9	7	8	8	8
6	N-90-12	8	8	7	9	7	9	8	8	8	8	7	9	7	8	7	9
7	N-90-14	7	8	8	8	7	9	7	8	7	9	7	8	7	9	8	8
8	N-91-15	6	9	7	9	9	7	7	9	7	9	6	10	7	9	7	9
9	Arman	7	8	7	9	7	9	7	9	6	11	7	8	8	8	7	9
10	N-92-10	9	7	9	7	9	8	4	12	9	7	9	7	9	7	9	7
11	N-92-12	9	7	10	7	9	7	5	11	9	8	9	7	9	7	9	7
12	Araz	6	10	7	9	7	9	6	10	7	9	8	8	8	9	7	9
13	S-83-4	3	13	3	12	3	13	3	13	4	12	4	12	4	12	4	12
14	S-84-14	3	13	3	12	3	13	3	13	4	12	4	12	4	12	4	12
15	S-91-6	7	9	8	8	7	9	7	8	8	8	8	9	7	8	8	8
16	M-91-6	7	8	7	9	6	10	6	9	8	8	7	8	7	9	8	8
17	M-91-10	9	7	9	7	9	7	6	10	9	7	10	7	10	6	10	6
18	C-87-11	9	7	9	7	9	7	9	8	9	7	9	7	9	7	9	7
19	C-87-12	8	8	9	7	8	9	8	8	8	8	8	9	9	8	9	7
20	C-87-13	8	8	9	8	9	7	8	8	8	7	8	8	9	7	9	7
21	C-88-13	8	7	9	7	8	9	7	9	8	9	7	8	7	9	9	7
22	C-89-6	8	8	9	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	9	8	8
23	C-89-7	8	8	9	7	8	7	8	8	7	9	7	9	7	9	8	8
24	C-89-15	9	7	9	7	7	8	8	8	8	8	7	8	8	9	8	8
25	SEP-49	2	14	3	13	2	14	3	12	3	13	2	14	3	13	4	12
26	SEP-58	9	7	4	12	9	7	9	7	5	11	6	10	4	12	6	10
27	SEP-59	4	12	5	11	9	7	4	12	3	12	4	12	4	12	5	11
28	Morocco*	11	6	10	7	11	6	10	7	11	6	10	7	10	7	11	6

*: رقم موروکو به عنوان شاهد حساس در نظر گرفته شد.



شکل ۱. گروه‌بندی ارقام تجاری و لاین‌های امیدبخش گندم بر اساس واکنش به نژادهای قارچ *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* با استفاده از روش وارد (Ward)

Figure 1. Classification of wheat cultivars and elite lines based on their reaction to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* races using Ward method

نژاد TKSTC (شناسایی شده در این پژوهش) مقاومت موثری ایجاد می‌کند، با استفاده از نشانگرهای مولکولی مرتبط مورد بررسی قرار گرفت. تنوع اللی نشانگرهای مولکولی پیوسته با این مکان‌های ژنی در ارقام تجاری و لاین‌های امیدبخش گندم در جدول ۷ ارایه شده است.

آزمون ژنتیکی مکان ژنی *Sr25/Lr19*

مکان ژنی *Sr25* از گونه‌ی *Agropyron elongatum* (syn. *Thinopyrum ponticum*) منشا گرفته و دارای پیوستگی بالایی با ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای *Lr19* می‌باشد. مکان ژنی *Sr25/Lr19* بر روی بازوی بلند کروموزوم 7D گندم قرار داشته و در مقابل نژاد Ug99 مقاومت موثری ایجاد می‌کند. در این پژوهش از نشانگر مولکولی اختصاصی Gb به‌منظور ردیابی این مکان ژنی استفاده شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز که در صورت وجود مکان ژنی *Sr25/Lr19* قطعه‌ای به‌طول ۱۳۰ جفت باز خواهد بود، بر روی ژل آگاروز دو درصد (وزنی/حجمی) بارگذاری و با استفاده از نور UV بررسی

جدول ۷. تنوع اللی نشانگرهای مولکولی پیوسته با مکان‌های ژنی مقاومت به زنگ سیاه در ارقام تجاری و لاین‌های امیدبخش گندم

Table 7. Allelic variation of molecular markers linked to stem rust resistance loci in wheat commercial cultivars and elite lines.

No.	Line	Sr25/Lr19	Sr26	Sr36	Sr38/Lr37/Yr17
1	Tirgan	0	0	0	0
2	Sarang	0	0	0	1
3	Zarineh	0	0	0	0
4	Mehregan	1	0	0	0
5	Euclide	0	0	0	0
6	N-90-12	0	0	0	0
7	N-90-14	0	0	0	0
8	N-91-15	0	0	0	0
9	Arman	0	0	0	0
10	N-92-10	0	0	0	1
11	N-92-12	0	0	0	1
12	Araz	0	0	0	0
13	S-83-4	0	0	0	0
14	S-84-14	0	0	0	0
15	S-91-6	0	0	0	0
16	M-91-6	0	0	0	0
17	M-91-10	0	0	0	1
18	C-87-11	0	0	0	0
19	C-87-12	0	0	0	0
20	C-87-13	0	0	0	0
21	C-88-13	0	0	0	0
22	C-89-6	0	0	0	0
23	C-89-7	0	0	0	0
24	C-89-15	0	0	0	0
25	SEP-49	0	0	0	0
26	SEP-58	1	0	0	0
27	SEP-59	0	0	0	0
28	Morocco	0	0	0	0

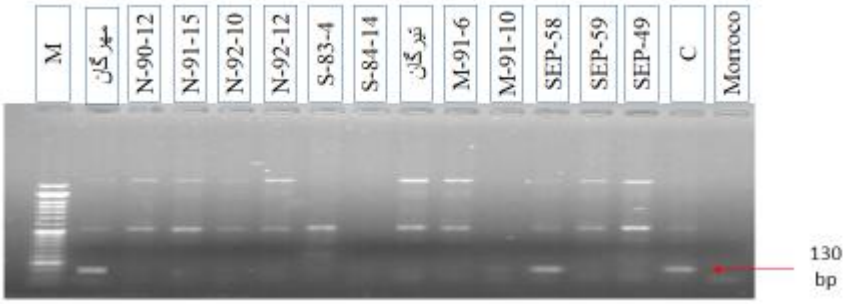
0= عدم وجود ژن مقاومت در ژنوتیپ 1= وجود ژن مقاومت در ژنوتیپ

(وزنی/حجمی) بارگذاری و با استفاده از نور UV بررسی شد. در نمونه‌های فاقد این مکان هیچ نواری تکثیر نمی‌گردد (Yu *et al*., 2010). به‌عنوان شاهد مثبت از لاین حامل این ژن به‌نام Agatha (Cl 14048)/9*LMPG-6 DK1 موجود در مجموعه ارقام گندم افتراقی بین‌المللی زنگ سیاه استفاده گردید.

آزمون ژنتیکی حضور و یا عدم حضور ژن *Sr25* در ژنوتیپ‌های مورد بررسی حاکی از آن بود که مکان ژنی *Sr25/Lr19* در لاین SEP-58 و رقم مهرگان وجود داشت و در سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی آلل مقاومت مشاهده نشد (شکل ۲). یو و همکاران (Yu *et al*., 2012) عدم حضور ژن مقاومت *Sr25* در گندم‌های مورد بررسی را به شجره ژرم پلاسم نسبت دادند. پات‌پور و همکاران با بررسی ۱۰۳ رقم و لاین پیشرفته‌ی گندم ایران وجود مکان ژنی *Sr25/Lr19* را در یکی از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه (M-85-17) گزارش نمودند (Patpour *et al*., 2014). لی و همکاران عدم وجود این مکان ژنی را در ۱۱۹ ژنوتیپ گندم چین گزارش نمودند (Li *et al*., 2016).

آزمون ژنتیکی *Sr26*

ژن مقاومت *Sr26* از *Agropyron elongatum* به بازوی

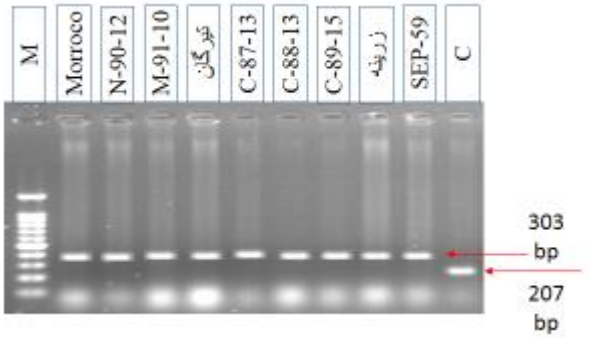


شکل ۲. شناسایی مکان ژنی *Sr25/Lr19* در ارقام و لاین‌های امیدبخش گندم بر روی ژل آگاروز دو درصد به‌صورت نوار ۱۳۰ جفت بازی با استفاده از نشانگر اختصاصی Gb. از چپ به راست M: نشانگر وزنی DNA، لاین‌های منتخب گندم، C: رقم شاهد مثبت Agatha (Cl 14048)/9*LMPG-6 DK1 و رقم شاهد حساس به بیماری (Morocco).

Figure 2. Identification of *Sr25 / Lr19* locus in wheat elite lines on 2% agarose gel as 130 bp band using the specific marker Gb. M: DNA weight marker, thirteen selected wheat lines, C: positive control cultivar (Agatha (Cl 14048) / 9 * LMPG-6 DK1), and disease susceptible control cultivar (Morocco).

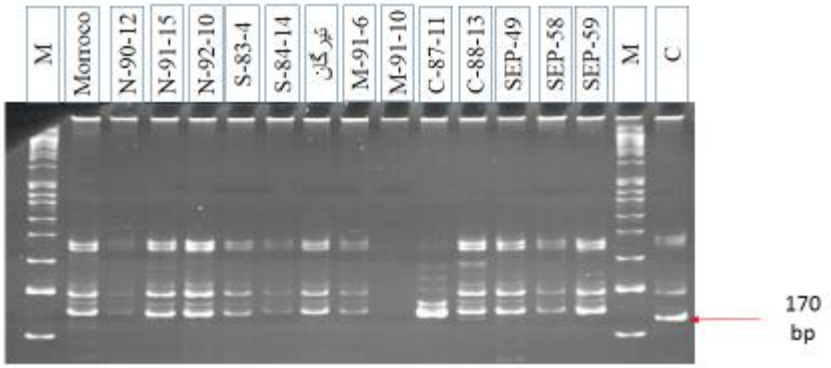
بلند کروموزوم 6A گندم هگزاپلوئید منتقل شده است. این ژن از معدود ژن‌های موثر در برابر نژاد TTKSK (Ug99) و واریانت TTKST می‌باشد. کارایی *Sr26* در برابر گروه نژادی Ug99، فراوانی کم آن در میان ارقام جدید و در دسترس بودن لاین‌های حامل، این ژن را به یکی از ژن‌های مناسب در برنامه‌های به‌نژادی گندم و راهبرد انتخاب به‌کمک نشانگر را به روش سریعی در هرمی کردن ژن‌های موثر در برابر Ug99 و واریانت‌های آن تبدیل نموده است.

برای ردیابی ژن مقاومت *Sr26* از ترکیب هم‌زمان دو نشانگر Sr26#43 برای تایید حضور ژن (Mago *et al.*, 2005) و BE518379 برای تایید عدم حضور ژن (Liu *et al.*, 2010) استفاده شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگاروز دو درصد (وزنی/حجمی) بارگذاری و با استفاده از نور UV مشاهده شد. چنان‌که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، ترکیب این دو نشانگر در گندم افتراقی حامل ژن مقاومت *Sr26* (لاین Eagle به‌عنوان شاهد مثبت) قطعه ۲۰۷ جفت بازی و در ژنوتیپ‌های فاقد این ژن قطعه ۳۰۳ جفت بازی را تکثیر می‌نماید. تکثیر قطعه ۳۰۳ جفت بازی در تمامی نمونه‌های مورد بررسی نشان



شکل ۳. شناسایی مکان ژنی *Sr26* در ارقام و لاین‌های امیدبخش گندم بر روی ژل آگارز دو درصد به‌صورت نوار ۲۰۷ (حضور ژن) و ۳۰۳ (عدم حضور ژن) جفت بازی به ترتیب با استفاده از نشانگرهای اختصاصی Sr26#43 و BE518379. از چپ به راست M: نشانگر وزنی DNA، رقم شاهد حساس به بیماری (Morocco)، لاین‌های منتخب گندم و C: رقم شاهد مثبت Eagle.

Figure 3. Identification of *Sr26* locus in wheat elite lines on 2% agarose gel as 207 and 303 bp bands (gene presence and absence, respectively) using the specific marker Sr26#43 and BE518379. M: DNA weight marker, disease susceptible control cultivar (Morocco), selected wheat lines, and C: the positive control cultivar Eagle.



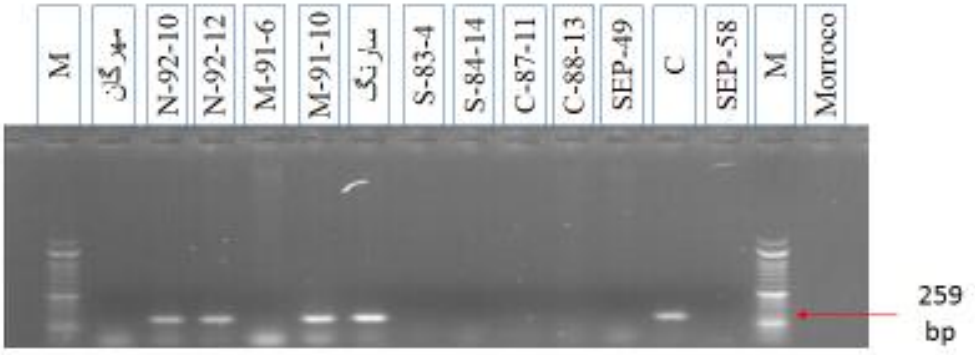
شکل ٤. شناسایی مکان ژنی *Sr36* در ارقام و لاین‌های امیدبخش گندم بر روی ژل پلی‌اکریلامید شش درصد به‌صورت نوار ۱۷۰ جفت بازی با استفاده از نشانگر اختصاصی GWM319. از چپ به راست M: نشانگر وزنی DNA، رقم شاهد حساس به بیماری (Morocco)، لاین‌های منتخب گندم و C: رقم شاهد مثبت W2691SrTt-1.

Figure 4. Identification of *Sr36* locus in wheat elite lines on 6% polyacrylamide gel as 170 bp band using a special marker GWM319. M: DNA weight marker, disease susceptible control cultivar (Morocco), selected wheat lines, and C: the positive control cultivar W2691SrTt-1.

داد که هیچ کدام از ژنوتیپ‌ها دارای ژن *Sr26* نبودند. در مطابقت با نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، پاتپور و همکاران (Patpour *et al*., 2014) و دادرضایی و نظری (Dadrezaei and Nazari, 2015) نیز به‌ترتیب با بررسی ۱۰۳ رقم و لاین پیشرفته و ۱۲٤ ژنوتیپ گندم ایران گزارش نمودند که مکان ژنی *Sr26* در هیچ یک از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه وجود نداشت. لی و همکاران نیز وجود این مکان ژنی را در هیچ یک از ۱۱۹ ژنوتیپ گندم چینی مورد بررسی گزارش ننمودند (Li *et al*., 2016).

آزمون ژنتیکی *Sr36*

ژن مقاومت *Sr36* که از گونه *Triticum timopheevii* به گندم نان منتقل شده و بر روی بازوی کوچک 2B گندم قرار دارد، سبب بروز مقاومت در برابر نژاد Ug99 عامل زنگ سیاه می‌گردد (Tsilo *et al*., 2008). اگرچه سایر نژادهای عامل بیماری در برابر *Sr36* پرآزاری دارند، اما کاربرد این ژن به‌همراه سایر ژن‌های مقاومت موثر برای ایجاد رقم مقاوم (بویژه رقمی که بتواند نسبت به نژاد Ug99 و اکثر واریانت‌های آن مقاومت ایجاد نماید) توصیه می‌شود. به‌منظور ردیابی ژن *Sr36* از نشانگر GWM319 استفاده شد که ارقام مقاوم و حساس را به‌ترتیب براساس حضور و عدم حضور یک قطعه ۱۷۰ جفت بازی تفکیک می‌کند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به روش تسیلو و همکاران (Tsilo *et al*., 2008) انجام و محصول واکنش بر روی ژل پلی اکریلامید شش درصد (وزنی/حجمی) بارگذاری شد. به‌عنوان شاهد مثبت مکان ژنی *Sr36* از لاین حامل این ژن به‌نام W2691SrTt-1 موجود در مجموعه ارقام گندم افتراقی زنگ سیاه استفاده گردید. آزمون ژنتیکی حضور و یا عدم حضور ژن *Sr36* در لاین‌های مورد بررسی حاکی از آن بود که ژن مقاومت *Sr36* در هیچ کدام از این لاین‌ها وجود نداشت (شکل ٤). پاتپور و همکاران نیز با بررسی ۱۰۳ رقم و لاین پیشرفته گندم ایران گزارش نمودند که در هیچ یک از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مکان ژنی *Sr36* وجود نداشت (Patpour *et al*., 2014).



شکل ۵. شناسایی مکان ژنی *Sr38/Lr37/Yr17* در ارقام و لاین‌های امید بخش گندم بر روی ژل آگارز دو درصد به‌صورت نوار ۲۵۹ جفت بازی با استفاده از نشانگرهای اختصاصی VENTRIUP و LN2. از چپ به راست M: نشانگر وزنی DNA، لاین‌های منتخب گندم، C: رقم شاهد مثبت VPM1 و رقم شاهد حساس به بیماری (Morocco).

Figure 5. Identification of *Sr38/Lr37/Yr17* locus in wheat elite lines on 2% agarose gel as 259 bp band using special markers VENTRIUP and LN2. M: DNA weight marker, selected wheat lines, C: the positive control cultivar VPM1, and disease susceptible control cultivar (Morocco).

آزمون ژنتیکی مکان ژنی *Sr38/Lr37/Yr17*

مکان ژنی *Sr38* که از گونه *Triticum ventricosum* به گندم نان منتقل شده و بر روی بازوی کوتاه کروموزوم 2A گندم قرار دارد (Bariana and McIntosh, 1994)، مقاومت گندم در مرحله گیاهچه‌ای را به‌صورت اختصاصی بروز داده و در یک مکان ژنی (*Sr38/Lr37/Yr17*) با ژن‌های مقاومت به زنگ زرد و قهوه‌ای *Yr17* و *Lr37* پیوسته می‌باشد. برای تشخیص حضور آلل موثر مکان ژنی *Sr38/Lr37/Yr17* از دو نشانگر مولکولی پیوسته به این مکان با نام‌های VENTRIUP و LN2 استفاده گردید. این نشانگرها حضور مکان ژنی مذکور را با تکثیر قطعه‌ای به‌طول ۲۵۹ جفت باز نشان می‌دهند. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگاروز دو درصد (وزنی/حجمی) بارگذاری و با استفاده از نور UV مشاهده شد. به‌عنوان شاهد مثبت از لاین VPM1 موجود در مجموعه ارقام گندم افتراقی بین المللی زنگ سیاه استفاده گردید. بررسی‌های انجام شده در این تحقیق نشان داد که مکان ژنی *Sr38/Lr37/Yr17* در لاین‌های گندم N-92-10، N-92-12، M-91-10 و رقم تجاری سارنگ وجود داشت (شکل ۵). در سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی آلل مقاومت مشاهده نشد. دادرضایی و نظری (Dadrezaei and Nazari, 2015) و لی و همکاران (Li *et al.*, 2016) در پژوهش‌های جداگانه‌ای به‌ترتیب بر روی ۱۲٤ ژنوتیپ گندم ایران و ۱۱۹ ژنوتیپ گندم چین، وجود این مکان ژنی را در هفت و ده ژنوتیپ گزارش نمودند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج بررسی‌های فنوتیپی نشان داد که ۱۵ درصد از ژنوتیپ‌ها (لاین‌های S-83-4، S-84-14، SEP-49 و SEP-59) نسبت به تمامی نژادهای مورد مطالعه مقاومت گیاهچه‌ای قابل قبولی داشتند، بنابراین به‌عنوان منابع مقاومت نسبت به نژادهای مورد بررسی در این پژوهش و نژادهای مشابه موجود در کشور معرفی می‌گردند. نتایج بررسی‌های مولکولی حاکی از آن بود که مکان ژنی *Sr25/Lr19* در رقم مهرگان و لاین SEP-58، و مکان ژنی *Sr38/Lr37/Yr17* در رقم سارنگ و لاین‌های N-92-10،

N-92-12 و M-91-10 وجود داشته و ژن‌های *Sr26* و *Sr36* در هیچ کدام از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شناسایی نشدند. برای سایر ژن‌های مقاومت به نژادهای موجود بیمارگر زنگ سیاه در کشور و بویژه نژاد Ug99 و واریانت‌های آن در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، مکان ژنی *Sr39/Lr35* در لاین SEP59 و مکان ژنی *Sr31/Yr9/Lr26/Pm8/Pm17* در لاین‌های S-84-14 و SEP49 گزارش شده است. مکان‌های ژنی *Sr24/Lr24* و *Sr22* در هیچ کدام از ژنوتیپ‌ها شناسایی نشده‌اند (Omrani *et al*., 2017). نتایج به‌دست آمده از این تحقیق و نتایج سایر پژوهش‌های انجام شده در کشور (Dadrezaei and Nazari, 2015; Patpour, 2013) نشان می‌دهد که فراوانی حضور ژن‌های مقاومت موثر نسبت به نژادهای موجود *Pgt* از جمله نژاد Ug99 و اکثر واریانت‌های آن در ارقام تجاری و لاین‌های امیدبخش گندم کشور پایین می‌باشد. با توجه به شواهد حضور نژاد Ug99 در کشور، به‌منظور کنترل غیرشیمیایی زنگ‌ها و با هدف تولید و معرفی ارقام مقاوم گندم، لازم است تا با پایش مولکولی ژن‌های مقاومت به زنگ سیاه نسبت به شناسایی و استفاده از ژنوتیپ‌های مقاوم و منابع مقاومت در برنامه‌های به‌نژادی گندم برای مقاومت به زنگ سیاه به‌ویژه نژاد Ug99 و واریانت‌های آن و همچنین نژادهای غالب *Pgt* اقدام شده و فراوانی حضور ژن‌های مقاومت موثر در ژرم‌پلاسم گندم کشور افزایش یابد. در تلاقی‌های طراحی شده برای برنامه‌های به‌نژادی گندم با هدف ایجاد مقاومت به زنگ سیاه می‌توان از ژنوتیپ‌های حامل ژن‌های مقاومت موثر شناسایی شده در این پژوهش به‌عنوان والد بخشنده استفاده نمود.

سپاسگزاری

مولفین مقاله از ریاست محترم موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، معاونت پژوهش و فناوری و همچنین رئیس بخش تحقیقات غلات آن موسسه، و همچنین آقایان و خانم‌ها مهندسین محسن سرهنگی، علیرضا دربندی، اسمعیل ابراهیمی میمند، امیر کبیری، زهره حسن‌بیات و الهام الاحسنی به‌علت فراهم ساختن امکانات لازم و مساعدت در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌کنند.

منابع

Afshari, F., Aghaee, M., Jalal Kamali, M.R., Roohparvar, R., Malihipour, A., Khodarahmi, M., Ebrahimnejad, Sh., Aghnum, R., Chaichi, M., Dadrezaei, S.T., Dalvand, M., Dehghan, M.A., Zakeri, A.K., Shahbazi, K., Safari, S.A., Tabatabaei, N., Atahoseini, M., Nabati, E., Hooshyar, R., Yasaei, M., Nasrollahi, M., Mehrabi, R., Ghaffary, T., Hashemi, M., Patpour, M., Bayat, Z. 2015. Surveillance and *Pgt* race analysis in Iran, 2014. Borlaug Global Rust Initiative, 123pp.

Anonymous. 2021. MAS Wheat. Available at https://maswheat.ucdavis.edu/protocols/*Sr36*/.

Bariana, H.S. and McIntosh, R.A. 1994. Characterisation and origin of rust and powdery mildew resistance genes in VPM1 wheat. Euphytica, 76(1): 53-61.

Bhattacharya S. 2017. Deadly new wheat disease threatens Europe's crops. Nature, 542:145-146.

Chen, S., Rouse, M. N., Zhang, W., Jin, Y., Akhunov, E., Wei, Y., & Dubcovsky, J. 2015. Fine mapping and characterization of *Sr21*, a temperature-sensitive diploid wheat resistance gene effective against the *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Ug99 race group. Theoretical and Applied Genetics, 128(4): 645-656.

Dadrezaei, S.T. and Nazari, K. 2015. Detection of wheat rust resistance genes in some Iranian wheat genotypes by molecular markers. Seed and Plant Improvement Journal, 31(3): 163-187 (in Persian).

Ejaz, M., Iqbal, M., Shahzad, A., Ahmed, I., and Ali, G. M. 2012. Genetic variation for markers linked to stem

rust resistance genes in Pakistani wheat varieties. Crop Science, 52(6): 2638-2648.
Francia, E., Tacconi, G., Crosatti, C., Barabaschi, D., Bulgarelli, D., Dall'Aglio, E., and Valè, G. 2005. Marker assisted selection in crop plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 82(1): 317-342.
Jin, Y., Szabo, L. J., Pretorius, Z. A., Singh, R. P., Ward, R., and Fetch, T. 2008. Detection of virulence to resistance gene *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Plant Disease 92(1): 923-926.
Li, T.Y., Cao, Y.Y., Wu, X.X., Xu, X.F. and Wang, W.L. 2016. Seedling resistance to stem rust and molecular marker analysis of resistance genes in wheat cultivars of Yunnan, China. Plos One, 11(10): 0165640.
Liu, S., Yu, L.X., Singh, R.P., Jin, Y., Sorrells, M.E. and Anderson, J.A. 2010. Diagnostic and co-dominant PCR markers for wheat stem rust resistance genes *Sr25* and *Sr26*. Theoretical and Applied Genetics, 120(4): 691-697.
Mago, R., Bariana, H.S., Dundas, I.S., Spielmeyer, W., Lawrence, G.J., Pryor, A.J. and Ellis, J.G. 2005. Development of PCR markers for the selection of wheat stem rust resistance genes *Sr24* and *Sr26* in diverse wheat germplasm. Theoretical and Applied Genetics, 111(3): 496-504.
McCallum, B.D., Hiebert, C.W., Cloutier, S., Bakkeren, G., Rosa, S.B., Humphreys, D.G., Marais, G.F., McCartney, C.A., Panwar, V., Rampitsch, C. and Saville, B.J. 2016. A review of wheat leaf rust research and the development of resistant cultivars in Canada. Canadian Journal of Plant Pathology, 38(1)*:* 1-18.
McIntosh, R.A., Wellings, C.R. and Park, R.F. 1995. Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes. Australia: CSIRO. Publications, Victoria, Australia. 200 pp.
Nazari, K., Mafi, M., Yahyaoui, A., Singh, R. P., and Park, R. P. 2009. Detection of wheat stem rust (*P. graminis* f. sp. *tritici*) race TTKSK (Ug99) in Iran. Plant Disease, 93:317.
Olivera P, Newcomb M, Szabo LJ, Rouse M, Johnson J, Gale S, Luster DG, Hodson D, Cox JA, Burgin L, Hort M, Gilligan CA, Patpour M, Justesen AF, Hovmøller MS, Woldeab G, Hailu E, Hundie B, Tadesse K, Pumphrey M, Singh RP, Jin Y. 2015. Phenotypic and genotypic characterization of race TKTTF of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* that caused a wheat stem rust Epidemic in Southern Ethiopia in 2013-14. Phytopathology, 105(2):917-928.
Omrani, A., Aharizad, S., Roohparvar, R., Khodarahmi, M., and Toorchi, M. 2017. Identification of stem and leaf rust resistance genes in some promising wheat lines using molecular markers. Journal of Crop Biotechnology, 18(3): 15-25 (in Persian).
Omrani, A. and Roohparvar, R. 2020. First report of TTKTK, a variant of the race TTKSK (Ug99) of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* with virulence on the resistance genes *Sr31* and *SrTmp* in Iran. Journal of Applied Research in Plant Protection 9(3): 87–89. (In Persian)
Omrani, A. and Roohparvar, R. 2021a. First report of TTRTF race of the wheat stem rust pathogen, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* from Iran (Northwest, Cold Zone). Journal of Applied Research in Plant Protection 9(4): 101–103. (In Persian)
Omrani, A, Roohparvar, R. 2021b. Occurence of the TTKSK (Ug99) race of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* from northwest of Iran (Hashtrood region). Journal of Applied Research in Plant Protection 10 (2): 91–93. (In Persian)
Patpour, M. 2013. Study on genetic and virulence diversity of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* populations in Iran and stem rust resistance genes in wheat. Ph.D. Thesis in agricultural biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran, 165 pp.
Patpour, M., Justesen, A.F., Tecle, A.W., Yazdani, M. and Hovmøller, M.S. 2020. First report of race TTRTF of wheat stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) in Eritrea. Plant Disease.
Patpour, M., Nazari, K., Ogbonnaya, F., Alavi, S.M. and Mousavi, A. 2014. Phenotypic and molecular characterization of resistance to stem rust in wheat cultivars and advanced breeding lines from Iran and Syria. Crop Breeding Journal, 4(1):1-14.
Roelfs, A.P., Singh, R.P. and Saari, E.E. 1992. Rust Disease of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management. CIMMIT, Mexico, D.F. 81 pp.
Saghai-Maroof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allard, R.W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences, 81(1): 8014-8019.
Singh, R.P., Hodson, D.P., Huerta-Espino, J., Jin, Y., Njau, P., Wanyera, R., Herrera-Foessel, S.A. and Ward,

R.W., 2008. Will stem rust destroy the world's wheat crop? Advances in agronomy, 98(2): 271-309.

Singh, R.P., Hodson, D.P., Jin, Y., Lagudah, E.S., Ayliffe, M.A., Bhavani, S., Rouse, M.N., Pretorius, Z.A., Szabo, L.J., Huerta-Espino, J., Basnet, B.R., Lan, C., and Hovmøller, M.S. 2015. Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: Continued threat to food security and prospects of genetic control. Phytopathology, 105(3): 872-884.

Stakman, E.C., Stewart, D.M. and Loegering, W.Q. 1962. Identification of physiologic races of *P. graminis* var. *tritici*. USDA, Agricultural Research Service. E617, Washington, USA.

Tsilo, T.J., Jin, Y. and Anderson, J.A. 2008. Diagnostic microsatellite markers for the detection of stem rust resistance gene in diverse genetic backgrounds of wheat. Crop Science, 48(1): 253-261.

Xu, X.F., Li, D.D., Liu, Y., Gao, Y., Wang, Z.Y., Ma, Y.C., Yang, S., Cao, Y.Y., Xuan, Y.H., and Li, T.Y. 2017. Evaluation and identification of stem rust resistance genes *Sr2, Sr24, Sr25, Sr26, Sr31* and *Sr38* in wheat lines from Gansu Province in China. PeerJ, 5, e4146.

Yang, H., Li, C., Lam, H.M., Clements, J., Yan, G. and Zhao, S. 2015. Sequencing consolidates molecular markers with plant breeding practice. Theoretical Applied Genetics, 128(1): 779-795.

Yu, L.X., Liu, S., Anderson, J.A., Singh, R.P., Jin, Y., Dubcovsky, J., Brown-Guidera, G., Bhavani, S., Morgounov, A., He, Z. and Huerta-Espino, J. 2010. Haplotype diversity of stem rust resistance loci in uncharacterized wheat lines. Molecular breeding, 26(4): 667-680.

Yu, L.X., Liu, S., Anderson, J.A., Singh, R.P., Jin, Y., Dubcovsky, J., Brown-Guidera, G., Bhavani, S., Morgounov, A., He, Z. and Huerta-Espino, J. 2012. Erratum to: Haplotype diversity of stem rust resistance loci in uncharacterized wheat lines. Molecular Breeding, 30(1): 613-614.