مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۲۵، شماره ۳، سال ۱۳۸۸

بررسی وراثت مقاومت به شته روسی در گندم

Inheritance of Resistance to Russian Aphid in Wheat

مهدی فاضل نجف آبادی[۱]، عباسعلی زالی[۲]، محمدرضا بی همتا[۲] و علیرضا طالعی[۲]

۱- دانشجوی سابق دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج
۲- استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱۰/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۴/۱۱

چکیده

فاضل نجف آبادی، م.، زالی، ع.، بی همتا، م. ر.، و طالعی، ع. ۱۳۸۸. بررسی وراثت مقاومت به شته روسی در گندم. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۵:** ۴۸۴ - ۴۷۱.

اخیراً چندین ژنوتیپ گندم مقاوم به بیوتیپ جدید (II) شتهٔ روسی شناسایی شده که لاین CI2401 یکی از مهم‌ترین آن‌ها است. به منظور مطالعهٔ مقاومت به این شته از جمعیت F_2 حاصل از تلاقی این لاین مقاوم با رقم زراعی و حساس Glupro استفاده شد. پس از کاشت جداگانهٔ بذرهای F_2، آلوده‌سازی گیاهچه‌ها در مرحلهٔ یک برگی با بیوتیپ II شتهٔ روسی انجام و مقاومت و حساسیت آن‌ها ۱۵ و ۲۰ روز بعد از آلوده سازی ارزیابی شد. بررسی نسبت‌های فنوتیپی در جمعیت F_2 با استفاده از آزمون مربع کای نشان داد که نسبت افراد حساس به مقاوم مطابق نسبت سادهٔ مندلی ۳:۱ است و بنابراین یک ژن غالب، مقاومت به بیوتیپ II شتهٔ روسی در این جمعیت را کنترل کرده است. به منظور تعیین محل این ژن مقاومت بر روی ژنوم گندم، از ۴۲ جفت آغازگر اختصاصی SSR که تمامی بازوهای کروموزومی را پوشش می‌دهد استفاده شد. آزمون مربع کای برای تک تک این نشانگرها هیچ‌گونه انحرافی از تفرق سادهٔ تک ژنی آن‌ها در این جمعیت نشان نداد. از بین تمامی این نشانگرها، تنها دو نشانگر Xbarc126 و Xgwm121 که جزء نشانگرهای اختصاصی کروموزوم شمارهٔ ۷ از ژنوم D گندم هستند با ژن مقاومت تا حدودی پیوسته بوده و سایر نشانگرها با این ژن پیوستگی نشان ندادند. این امر نشان دهندهٔ آن است که این ژن مقاومت نیز همانند بسیاری دیگر از ژن‌های مقاومت شناسایی شدهٔ قبلی بر روی کروموزوم 7D گندم قرار گرفته است و می‌توان از آن برای تولید ارقام مقاوم جدید استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: گندم نان، شتهٔ روسی، مقاومت، بیوتیپ، توالی‌های کوتاه تکرار شونده.

نویسنده مسئول: fazelm@ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

گندم یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی است که غذای روزمرهٔ بیش از نیمی از ساکنین کرهٔ زمین را تامین می‌کند (Johnson *et al.*, 1978). شتهٔ روسی *Diuraphis noxia* (Mordvilko) یکی از آفاتی است که سالیانه خسارت زیادی به مزارع گندم و جو وارد می‌کند. این حشره بومی کشورهای افغانستان، ایران، جنوب روسیه و کشورهای حاشیهٔ دریای مدیترانه است (Hewitt *et al.*, 1984). در سال ۱۹۸۶ برای اولین بار گزارشی از حضور و خسارت این آفت (بیوتیپ I یا اولیه) در ایالات متحدهٔ امریکا منتشر شد ولی گزارشی از وجود آن در کشور استرالیا منتشر نشده است (Stoetzel, 1987). در ایران نیز معین نمینی و امیر نظری (Moein-Namini and Amir-Nazari, 1995) گزارش کردند که مزارع گندم در بعضی استان‌های ایران به شتهٔ روسی آلوده بوده و شدت آلودگی آن در استان‌های سمنان، سیستان و بلوچستان، خراسان و فارس به حدی بوده که علیه آن مبارزهٔ شیمیایی انجام شده است.

علائم خسارت ناشی از تغذیهٔ شتهٔ روسی روی غلات تا شدن و پیچ خوردن برگ‌ها، کلروز برگ‌ها، کاهش کلروفیل و در آلودگی‌های شدید مرگ گیاه است (Walters *et al.*, 1980). شته‌ها آنزیم‌های بزاقی خود را درون پارانشیم برگ تزریق کرده و شیرهٔ پروردهٔ گیاه را از آوندهای آبکش می‌مکند. این آنزیم‌ها باعث تخریب ساختمان کلروفیل و سفید شدن، زرد شدن یا ارغوانی شدن برگ‌ها می‌شوند (Pike *et al.*, 1991؛ Fouche *et al.*, 1984). تخریب کلروفیل نیز باعث کاهش کارآیی فتوسنتز، باز ماندن گیاه از رشد و حساس شدن به عوامل محیطی می‌شود.

حشره‌کش‌های سیستمیک می‌توانند شتهٔ روسی را تا حد قابل ملاحظه‌ای کنترل کنند (Webster *et al.*, 1987). در برخی شرایط عملیات زراعی و کنترل بیولوژیکی نیز می‌تواند خسارت این آفت را کنترل کند (Prinsloo, 2000؛ Wraight *et al.*, 1993)، هر چند پنهان شدن شته‌ها در داخل برگ‌های لوله شده، کنترل آن‌ها توسط روش‌های بیولوژیکی و شیمیایی غیر سیستمیک را پیچیده می‌کند. استفاده از ارقام مقاوم از نظر اکولوژیکی، بیولوژیکی و اقتصادی برای کنترل این آفت روش مناسبی به نظر می‌رسد.

تا کنون از بین حدود ۱۰۰ ژنوتیپ مقاوم به شتهٔ روسی، ده ژن مقاومت که آن‌ها را با حروف اختصاری *Dn* نشان می‌دهند از گندم و یک ژن مقاومت از چاودار شناسایی شده و نحوهٔ توارث و کروموزوم حامل این ژن‌ها در ژنوم گندم مطالعه و مشخص شده است. مطالعهٔ رابطهٔ آللی ژن‌های مقاومت شناسایی شده با منشا گندم نان نشان داد که تمامی این ژن‌های مقاومت بر روی ژنوم D مربوط به گندم‌های هگزاپلوئید قرار دارند (Arzani *et al.*, 2004؛ Liu *et al.*, 2002 and 2005)؛ با این حال در

Archive of SID

www.SID.ir

ایـران مقاومـت نـسبت بـه شـتهٔ روسـی هـم در ژنوتیـپ‌هـای تتراپلوئیـد و هـم در ژنوتیـپ‌هـای هگزاپلوئید گندم گزارش شده است، بـه عنـوان مثال ژن مقاومتی از ژنوتیپ شـماره ۱۸۸۱ گنـدم تتراپلوئیـد ایرانـی کـه فاقـد ایـن ژنـوم اسـت را می‌توان نام بـرد (Estakhr and Assad, 2002؛ Assad, 2002).

در سال ۲۰۰۳ یک بیوتیپ جدید شتهٔ روسی که به عنوان بیوتیپ II شناخته می‌شود از جنوب شـرقی ایالـت کلـرادوی امریکـا گـزارش شـد (Haley *et al*., 2004). همـه سـاله نیـز احتمـال به وجـود آمـدن بیوتیـپ‌هـای جدیـد ایـن آفـت وجود دارد که در صورت کنترل نشدن به مزارع غلات خسارت وارد خواهـد کـرد. ایـن بیوتیـپ جدید قادر است تمامی ژنوتیپ‌های گندم مقاوم نـسبت بـه بیوتیـپ‌هـای قبلـی کـه تـا آن زمـان شناسایی شده بودند را آلوده کنـد و تقریبـاً تنهـا ژنی که مقاومتی قوی نسبت به این بیوتیپ نـشان می‌دهد ژن *Dn*7 است که در چـاودار شناسـایی شده اسـت. از سـوی دیگـر بـر اسـاس مطالعـات متعددی مشخص شده که جوامع شتهٔ روسـی در آسیا، امریکای شمالی و امریکای جنوبی قابلیـت شکستن مقاومت ژن‌هـای مختلـف بـه خـصوص *Dn*4 کـه تنهـا ژن مقاومـت اسـتفاده شـده در ارقـام تجـاری گنـدم اسـت، را دارنـد (Hawley *et al*., 2003؛ Smith *et al*., 2004؛ Basky, 2003؛ Puterka *et al*., 1992). بیوتیپ II شتهٔ روسی نیـز از ایـن قاعـده مـستثنی نبـوده و بـر روی گیاهـان دارای ژن *Dn*4 ایجـاد خسارت می‌کنـد. ایـن موضـوع اهمیـت و لـزوم بیش از پیش شناسایی و خصوصیت‌یابی ژن‌هـای جدید مقاومت نسبت بـه ایـن آفـت در گنـدم را نشان می‌دهد.

دانـگ و همکـاران (Dong *et al*., 1997) ژنوتیپ CI2401 را به عنوان یک ژنوتیپ مقاوم نسبت به بیوتیپ I شتهٔ روسی کـه حـاوی دو ژن مقاومـت غالـب اسـت شناسـایی کردنـد. در آزمـایش‌هـای ارزیـابی مقـدماتی گیاهچـه‌ای در سال ۲۰۰۳ نسبت به شتهٔ روسی مشخص شد کـه این ژنوتیپ نسبت به بیوتیپ II نیـز مقـاوم اسـت (Voothuluru *et al*., 2006). اخیـرا کـالینز و همکاران (Collins *et al*., 2005) نیـز مقاومـت نسبت بـه بیوتیـپ II شـتهٔ روسـی را در ژنوتیـپ CI2401 و ۳۹ ژنوتیـپ دیگـر گنـدم شناسـایی کرده‌اند. در ایـن آزمـایش‌هـای سـطح مقاومـت ژنوتیپ CI2401 و چندین ژنوتیپ دیگر مـشابه مقاومـت مـشاهده شـده در لایـن 94M370 کـه حامـل ژن *Dn*7 اسـت ارزیـابی شـده اسـت. در ایـران بـا توجـه بـه اهمیـت ایـن آفـت و نیـاز بـه شناسایی منابع مقاومـت بـه آن و همچنـین تحـوه توارث مقاومت در گندم نـسبت بـه شـته روسـی مطالعـات معـدودی انجـام شـده اسـت (Moharramipour *et al*., 2002؛ Najafi Mirak *et al*., 2004؛ Arzani, 2007).

آزمایش حاضر به منظـور مطالعـهٔ چگـونگی توارث مقاومت نسبت به بیوتیـپ II شـتهٔ روسـی در لاین CI2401، تعیـین تعـداد ژن‌هـای کنتـرل کنندهٔ این مقاومـت و همچنـین مـشخص کـردن

Archive of SID

www.SID.ir

محل قرار گرفتن این ژن یا ژن‌های مقاومت بر روی ژنوم گندم طراحی و انجام شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال‌های ۲۰۰۶ و ۲۰۰۷ در دانشگاه ایالتی کلرادو انجام شد. مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل ۱۵۸ نتاج F_2 حاصل از تلاقی لاین CI2401 و رقم Glupro بود. لاین CI2401 با منشاء تاجیکستان قبلا به عنوان لاین مقاوم به بیوتیپ II شتهٔ روسی شناسایی شده و رقم تجاری گندم نان Glupro در دانشگاه داکوتای شمالی اصلاح شده و فاقد هر گونه ژن مقاومت نسبت به بیوتیپ II شتهٔ روسی است (Collins *et al.*, 2005؛ Dong *et al.*, 1997؛ Voothuluru *et al.*, 2006).

پس از تلاقی دو لاین و به دست آوردن بذرهای F_1، این بذرها در شرایط گلخانه کاشته شدند و بذرهای F_2 از هر گیاه به طور جداگانه برداشت شدند. ارزیابی واکنش گیاهان F_2 نسبت به بیوتیپ II شتهٔ روسی در گلخانهٔ مخصوص حشره‌شناسی انجام شد. در این آزمایش‌ها از شته‌هایی که قبلا در شرایط ایزوله تکثیر شده بودند استفاده شد. به منظور ارزیابی گیاهان نسبت به شته، بذرهای F_2 در سینی‌های پلاستیکی به ابعاد تقریبی ۷×۴۰×۲۰ سانتی‌متر که متشکل از ۱۲×۶ گلدان کوچک مربع شکل به ابعاد تقریبی ۷×۳×۳ سانتی‌متر بود کاشته شدند. برای تشخیص صحیح واکنش گیاهان F_2 نسبت به شته و ارزیابی بهتر، بذر والدین مقاوم و حساس نیز در چند قسمت از هر سینی کاشته شد.

پنج روز پس از کاشت بذرها، یعنی زمانی که اولین برگ گیاهچه‌ها به اندازهٔ حدود ۳ تا ۴ سانتی‌متر از سطح خاک خارج شده بود، اقدام به آلوده‌سازی آن‌ها به شته شد. این کار به وسیله قلم‌موی نرم نقاشی انجام شد، به این صورت که از شته‌هایی که قبلا تهیه شده بود، تعداد حداقل پنج عدد شته بر روی هر گیاه قرار داده شد. این تعداد شته حداقل تعدادی است که می‌تواند گیاهان حساس را از مقاوم طی یک دورهٔ کوتاه متمایز کند. البته گاهی تعداد بیشتری شته نیز بر روی گیاهان قرار می‌گرفت (به ندرت تا ده عدد) ولی به کار بردن بیشتر از پنج عدد شته حتی تا پانزده عدد نیز تفاوت معنی‌داری در بروز مقاومت و حساسیت گیاهچه‌ها ایجاد نمی‌کرد ولی به کار بردن کم‌تر از پنج عدد شته بروز علایم حساسیت گیاهان را به تاخیر می‌انداخت (مشاهدات نگارندگان).

شاخص‌هایی که در ارزیابی گیاهان نسبت به خسارت ناشی از شتهٔ روسی مورد استفاده قرار گرفت میزان زردی برگ‌ها و همچنین مقدار پیچیدگی آن‌ها بود. زردی برگ‌ها به صورت نقطه‌ها یا لکه‌های زرد یا سفید ظاهر می‌شود که از صفر درصد برای گیاهان مقاوم تا صد درصد برای گیاهان حساس متغیر است. پیچیدگی برگ‌ها نیز به صورت لوله شدن برگ‌ها یا پیچ خوردن برگ‌های ابتدایی‌تر و خارج نشدن برگ‌های جدید نمایان می‌شود

Archive of SID

www.SID.ir

(Webster *et al*., 1987). بر این اساس ارزیابی گیاهچه‌ها به صورت ظاهری و در مقایسه با واکنش والدین مقاوم و حساس و هر دو شاخص زردی و پیچیدگی برگ‌ها مشخص شد. همان‌گونه که در بسیاری از پژوهش‌های قبلی مانند پژوهش‌های لیو و همکاران (۲۰۰۲) نیز انجام شده، گیاهان دارای برگ‌های پیچیده و لکه‌های زرد به عنوان حساس و گیاهان دارای برگهای صاف و بدون زردی یا زردی کم مقاوم در نظر گرفته شدند. معمولاً در ارزیابی واکنش گیاهچه‌های آلوده به شتهٔ روسی، شناسایی گیاهان مقاوم از حساس کاری بسیار ساده است چرا که اولین علامت حساسیت گیاهچه‌ها پیچیدگی برگ‌ها است که حتی گاهی مانع از خروج برگ‌های ثانویه نیز می‌شود.

حدود یک هفته پس از آلوده‌سازی یا ده روز پس از کاشت، واکنش تک تک گیاهان نسبت به شته به صورت جداگانه ارزیابی و به صورت مقاوم (R) (گیاهان دارای برگ‌های صاف و غیر پیچیده و بدون زردی یا زردی کم) و حساس (S) (گیاهان دارای برگ‌های پیچیده و داری زردی متوسط تا زیاد) در مقایسه با والدین بر اساس روش لیو و همکاران (Liu *et al*., 2002) یادداشت شد. پنج روز پس از این یادداشت برداری یعنی حدود دو هفته یا پانزده روز پس از کاشت نیز به منظور اطمینان از مقاوم بودن گیاهانی که در مرحلهٔ اول مقاومت نشان داده بودند مجددا گیاهان مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این زمان والد حساس دارای برگ‌های کاملاً پیچیده و زرد بود و والد مقاوم برگ‌هایی کاملاً مسطح، صاف و سبز داشت.. البته در برخی از گیاهچه‌های مربوط به والد مقاوم تعداد بسیار کمی نقاط ریز زرد رنگ (کمتر از ۵ درصد سطح برگ) که نشان دهندهٔ اثر تغذیهٔ شته‌ها بود مشاهده می‌شد که این امری طبیعی بود. پس از یادداشت برداری دوم شته‌های موجود بر روی گیاهان با استفاده از حشره‌کش ایمیداکلپرید (Imidacloprid) از بین رفته و به گیاهان اجازه داده شد تا به رشد خود ادامه دهند. بعد از رشد گیاهان، از هر کدام یک نمونهٔ برگ تازه انتخاب و DNA آن با تغییرات جزئی در روش ادواردز و همکاران (Edwards *et al*., 1991) استخراج شد.

آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق از نوع مایکروستلایت یا توالی‌های کوتاه تکرار شونده بودند. پس از غربال بیش از ۲۰۰ آغازگر که مشخصات آن‌ها در وب‌سایت Graingene موجود است (http://wheat.pw.usda.gov)) بر روی DNA والدین و با استفاده از ژل آگارز ۳ درصد، از بین ۵۸ آغازگر چند شکل، تعداد ۴۲ جفت آغازگر SSR متعلق به بازوهای مختلف کروموزومی گندم نان که بین والدین چندشکلی نشان دادند انتخاب شد (جدول ۱). انتخاب آغازگرهای چندشکل به صورت هدفمند و با توجه به اختصاصی بودن آن‌ها بر روی ژنوم انجام شد یعنی پس از یافتن آغازگرهای چندشکل برای یک گروه لینکاژی، دیگر آغازگری مربوط به آن گروه

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- نشانگرهای ریزماهوارهٔ چند شکل بین والدین و متعلق به تمامی گروه‌های لینکاژی برای تعیین موقعیت ژن(های) مقاومت به شته روسی بر روی ژنوم گندم

Table 1. Polymorphic microsatellite markers between parents covering all the wheat genome for determination of Russian aphid resistant gene(s) linkage group

شمارهٔ کروموزوم Chromosome number	ژنوم Genome		
	A	B	C
1	Xgwm136	Xpsp3000	Xgwm106
	Xbac17	Xgwm153	Xbarc148
2	Xgwm473	Xgwm148	Xgwm210
	Xgwm265	Xgwm526	Xgwm301
3	Xgwm2	Xgwm77	Xgwm314
	Xgwm391	Xgwm299	Xgwm383
4	Xgwm165	Xgwm113	Xpsp3079
	Xgwm637	Xgwm495	Xgwm192
5	Xgwm304	Xgwm540	Xgwm174
	Xgwm617	Xgwm335	Xgwm192
6	Xpsp3029	Xgwm508	Xpsp3200
	Xbac171	Xgwm193	Xcfd45
7	Xgwm260	Xgwm537	Xgwm121
	Xgwm276	Xgwm146	Xbarc126

برای آزمودن انتخاب نشد.

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از تمامی جفت پرایمرهای انتخاب شده مربوط به هر یک از بازوهای کروموزومی و بر روی DNA افراد F_2 طبق برنامهٔ ارائه شده در جدول ۲ انجام شد.

محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۳ درصد تفکیک و توسط محلول اتیدیوم بروماید $0/5\ mgml^{-1}$ رنگ‌آمیزی شدند. عکس‌برداری از ژل‌ها نیز با اشعهٔ ماورای بنفش انجام شد. پس از اتمام کار آزمایشگاهی، نمره‌دهی افراد F_2 برای نشانگرهای ژنتیکی ریزماهواره و همچنین ژن مقاومت نسبت به بیوتیپ II شتهٔ روسی بر اساس روش لَندر و همکاران (Lander *et al*., 1987) انجام شد. در این روش برای نشانگرهای هم‌بارز از حروف (a، h و b) و برای نشانگرهای غالب بسته به حضور آلل غالب در یکی از والدین از حروف (a و c) یا (b و d) استفاده می‌شود (Lander *et al*., 1987). چون حدود سه چهارم از نتاج F_2 نسبت به بیوتیپ II شتهٔ روسی مقاوم بودند، مقاومت و حساسیت افراد F_2 نیز به صورت یک ژن غالب در نظر گرفته شد. در مورد هر ۴۳ نشانگر به کار رفته در این تحقیق یعنی ۴۲ نشانگر مولکولی و یک نشانگر فنوتیپی مقاومت، آزمون نیکویی برازش با نسبت‌های ۳:۱ برای نشانگرهای غالب و نسبت‌های ۱:۲:۱ برای نشانگرهای هم‌بارز بر اساس آزمون مربع کای انجام شد. در نهایت داده‌های حاصل از نمره‌دهی فنوتیپی و ژنوتیپی افراد F_2 با استفاده از

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- تعداد و ترتیب چرخه‌های مورد استفاده در تکثیر قطعات DNA ژنومی در تحقیق حاضر
Table 2. Polymerase Chain Reaction cycles used in the present study

شمارهٔ چرخه Cycle no.	واکنش Reaction	تعداد دفعات تکرار Cycles	درجه حرارت Temperature (℃)	زمان Time
1	واسرشته نمودن اولیهٔ DNA Preliminary denaturing of DNA	1	94	5 min
2-1	واسرشته نمودن DNA DNA denaturing	35	94	45 sec
2-2	اتصال پرایمر Annealing of primer		دمای اتصال پرایمر Annealing temperature	45 sec
2-3	بسط نسخهٔ رونوشت Extension		72	1.5 min
3	بسط نهایی نسخه‌های رونوشت باقیمانده A final extension	1	72	5 min
4	نگهداری موقت محصولات تکثیر شده Temporarily conservation of PCR products	1	4	تا زمان تفکیک بر روی ژل Till running on the gel

نرم‌افزار Mapmaker 3.0 بر اساس نسبت افراد نوترکیب بین دو به دوی مکان‌های ژنی در جمعیت F_2 و تابع حداکثر درست‌نمایی با مقدار LOD بیشتر از ۳ مورد تجزیه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

توارث مقاومت و تعداد ژن‌های کنترل‌کنندهٔ آن

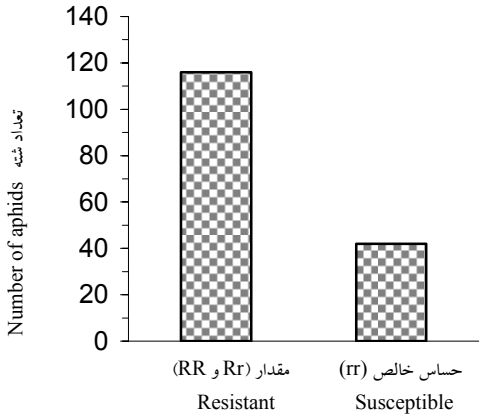
اولین هدف از این مطالعه مشخص کردن نحوهٔ توارث و تعداد ژنهای دخیل در مقاومت به بیوتیپ II شتهٔ روسی در لاین CI2401 بود. از ۱۵۸ فرد F_2، ۴۲ فرد (۲۶/۶ درصد) نسبت به بیوتیپ جدید شتهٔ روسی حساس و ۱۱۶ فرد بقیه (۷۳/۴ درصد) مقاومت نشان دادند (شکل ۱).

آزمون مربع کای نشان داد که این تعداد با نسبت‌های تک ژنی مندلی یعنی ۱ حساس : ۳ مقاوم مطابقت دارد ($P = ۰/۶۴۶$ ، $\chi^2 = ۰/۲۱$) بنابراین به احتمال زیاد مقاومت نسبت به شتهٔ روسی در این جمعیت توسط یک ژن غالب کنترل می‌شود.

این نتیجه با نتایج دانگ و همکاران (Dong *et al.*, 1997) و همچنین ووتولورو و همکاران (Voothuluru *et al.*, 2006) مغایرت دارد چرا که آن‌ها دو ژن را در مقاومت لاین CI2401 نسبت به شتهٔ روسی دخیل دانسته‌اند. البته دانگ و همکاران (۱۹۹۷) در آزمایش خود از بیوتیپ I که بیوتیپ متفاوت و ضعیف‌تری نسبت به بیوتیپ II است استفاده کردند بر اساس

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- تعداد افراد مقاوم و حساس نسبت به بیوتیپ II شتهٔ روسی در جمعیت F_2
Fig. 1. Number of resistant and susceptible individuals to biotype II of Russian wheat aphid in F_2 population

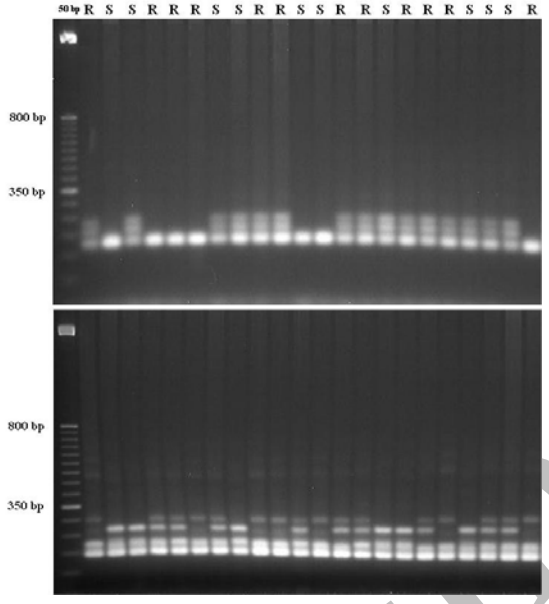
گزارش آن‌ها یکی از این ژن‌ها همان ژن *Dn*4 است که بیوتیپ جدید (II) شتهٔ روسی بر روی آن خسارتزا است(Smith *et al.*, 2004؛ Hawley *et al.*, 2003)؛ از طرف دیگر در آزمایش ووتولورو و همکاران (۲۰۰۶) حدود ۴۰ درصد از خانواده‌های $F_{2:3}$ جوانه نزدند (از بین ۹۶ خانواده) و آن‌هایی هم که جوانه زدند کمتر از ۱۲ عدد بذر تولید کردند که این موضوع نتایج آن‌ها را مورد تردید قرار می‌دهد چرا که اولا تعداد کل خانواده‌های مورد استفاده در آزمایش آن‌ها کم بوده و ثانیاً به نظر می‌رسد که مشکلی در جوانه‌زنی گیاهان وجود داشته است که مشخص نیست در اثر آلودگی گیاهان نسل قبل بوده یا دلیل دیگری وجود داشته است. در هر صورت در تحقیق حاضر مطابق نتایج به دست آمده با توجه به نسبت سه گیاه مقاوم در برابر یک گیاه حساس در نسل F_2 به نظر می‌رسد که مقاومت نسبت به بیوتیپ II شتهٔ روسی در لاین CI2401 توسط یک ژن غالب کنترل می‌شود.

مکان‌یابی ژن مقاومت نسبت به بیوتیپ II شتهٔ روسی

پس از آن‌که مشخص شد مقاومت نسبت به بیوتیپ II شتهٔ روسی در لاین CI2401 توسط یک ژن یا حداقل یک ناحیهٔ کروموزومی که رفتار مشابه یک ژن واحد دارد کنترل می‌شود لازم بود محل قرار گرفتن آن بر روی ژنوم مشخص شود. پس از تعیین ۴۲ نشانگر چندشکل بین والدین، نسبت‌های ژنوتیپی حاصل از رتبه‌دهی این نشانگرها بر روی DNA مربوط به تمامی افراد نسل F۲ در مقایسه با والدین مقاوم و حساس، که نمونه‌ای از آن در شکل ۲ مشاهده می‌شود، محاسبه شد (جدول ۳). لازم به ذکر است که هر چند نشانگرهای ریزماهواره از نوع هم‌بارز هستند، ولی گاهی به دلیل ماهیت ژنتیکی والدین مورد استفاده، رفتاری شبیه به نشانگرهای غالب بروز می‌دهند

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- تصویر مربوط به ژل‌های حاصل از دو آغازگر Xgwm210 (بالا) و Xbarc126 (پایین)

ستون‌ها به ترتیب از سمت چپ عبارتند از: DNA استاندارد ۵۰ bp، والد مقاوم، والد حساس و ۲۰ فرد F_2 که مقاومت و حساسیت آن‌ها به شته روسی گندم در بالای هر ستون مشخص شده است (مقاوم = R و حساس = S).

Fig. 2. Xgwm210 (up) and Xgwm126 (down) markers ran on a part of F_2 population on agarose gels

Lanes from left are 50 bp standard ladder, resistant parent, susceptible parent and 20 F2 individuals with their reactions to biotype II on top of each lane respectively (R=resistant and S=susceptible).

یعنی یکی از آلل‌ها قابل تشخیص نیستند که این موضوع در قسمت بالای شکل ۲ کاملا مشخص است. آزمون مربع کای برای مطابقت این نسبت‌ها با نسبت‌های ۳:۱ برای نشانگرهای غالب و نسبت‌های ۱:۲:۱ برای نشانگرهای هم‌بارز نشان داد که انحراف آماری معنی‌داری از نسبت‌های مورد انتظار وجود ندارد (جدول ۳).

محاسبهٔ درصد کراسینگ اوور یا میزان فاصلهٔ هر یک از نشانگرهای SSR از نشانگر فنوتیپی مقاومت (ژن مقاومت نسبت به بیوتیپ II شتهٔ روسی) و گروه‌بندی تمامی نشانگرها به همراه ژن مقاومت توسط نرم افزار Mapmaker، نشان داد که تنها نشانگرهای مربوط به کروموزوم شمارهٔ ۷ از ژنوم D فاصله‌ای کمتر از ۵۰ سانتی‌مورگان از ژن مقاومت داشته و در یک گروه قرار می‌گیرند. در این گروه نشانگر Xbarc126 با فاصلهٔ ۴۴/۷ سانتی‌مورگان در یک طرف و نشانگر Xgwm121 با فاصلهٔ ۲۶/۳ سانتی‌مورگان از ژن مقاومت در طرف دیگر قرار داشته و فاصلهٔ سایر نشانگرها از ژن مقاومت بیشتر از ۵۰ سانتی‌مورگان برآورد شد که در گروه‌های دیگر مطابق جدول ۳ قرار گرفتند.

همانگونه که توسط لیو و همکاران (Liu *et al.*, 2002 و 2005) و بسیاری دیگر از محققین نیز اشاره شده است، ژن‌های مقاومتی که تاکنون نسبت به شتهٔ روسی شناسایی شده‌اند بر روی کروموزوم‌های 1D و 7D قرار دارند (غیر

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- نتایج حاصل از تجزیهٔ ژنوتیپی نشانگرهای ریزماهواره در جمعیت F_2 به همراه ژن مقاومت نسبت به بیوتیپ II شتهٔ روسی

Table 3. Mapmaker grouping results of microsatellite markers and Russian wheat aphid resistance gene in the F2 population

گروه لینکاژی	مارکر	تعداد افراد شبیه به والد مقاوم (a)	تعداد افراد شبیه به هر دو والد یا هتروزیگوت (h)	تعداد افراد شبیه به والد حساس (b)	تعداد افراد غیر مشابه با والد مقاوم (c)	تعداد افراد غیر مشابه با والد حساس (d)	تعداد دادهٔ گم‌شده (-)	χ^2 برای نسبت‌های ۳:۱ یا ۱:۲:۱	P
Linkage group	Marker	Resistant parent type (a)	Heterozygote type (h)	Susceptible parent type (b)	Non-resistant parent type (c)	Non-susceptible parent type (d)	Missing	χ^2 for 3:1 or 1:2:1 ratios	
1A	Xgwm136	34	78	45	0	0	1	1.55	0.46
	Xbac17	37	0	0	108	0	13	0.02	0.88
2A	Xgwm473	29	77	42	0	0	10	2.53	0.28
	Xgwm265	39	0	0	101	0	18	0.61	0.43
3A	Xgwm2	28	76	41	0	0	13	2.67	0.26
	Xgwm391	33	80	34	0	0	11	1.16	0.56
4A	Xgwm165	35	87	36	0	0	0	1.63	0.44
	Xgwm637	43	0	0	112	0	3	0.62	0.43
5A	Xgwm304	32	77	32	0	0	17	1.20	0.55
	Xgwm617	0	0	44	0	114	0	0.68	0.41
6A	Xpsp3029	0	0	39	0	107	12	0.23	0.63
	Xbac171	0	0	38	0	119	1	0.05	0.82
7A	Xgwm260	0	0	33	0	125	0	1.43	0.23
	Xgwm276	32	79	41	0	0	6	1.30	0.52
1B	Xpsp3000	35	81	42	0	0	0	0.72	0.70
	Xgwm153	36	79	43	0	0	0	0.62	0.73
2B	Xgwm148	0	0	45	0	101	12	2.64	0.10
	Xgwm526	43	0	0	109	0	6	0.88	0.35
3B	Xgwm77	0	0	47	0	105	6	2.84	0.09
	Xgwm299	41	0	0	97	0	20	1.63	0.20
4B	Xgwm113	0	0	46	0	107	5	2.09	0.15
	Xgwm495	0	0	48	0	109	1	2.60	0.11
5B	Xgwm540	0	0	32	0	117	9	0.99	0.32
	Xgwm335	38	0	0	107	0	13	0.11	0.74
6B	Xgwm508	0	0	37	0	121	0	0.21	0.65
	Xgwm193	38	0	0	104	0	16	0.23	0.63
7B	Xgwm537	41	82	35	0	0	0	0.68	0.71
	Xgwm146	36	0	0	122	0	0	0.41	0.52
1D	Xgwm106	0	0	42	0	116	0	0.21	0.65
	Xbarc148	34	0	0	118	0	6	0.56	0.45
2D	Xgwm210	0	0	35	0	122	1	0.61	0.43
	Xgwm301	0	0	33	0	107	18	0.15	0.69
3D	Xgwm314	36	0	0	113	0	9	0.06	0.80
	Xgwm383	35	0	0	116	0	7	0.27	0.60
4D	Xpsp3079	0	0	31	0	98	29	0.06	0.80
	Xgwm192	36	85	37	0	0	0	0.92	0.63
5D	Xgwm174	43	76	38	0	0	1	0.48	0.79
	Xgwm192	33	0	0	107	0	18	0.15	0.70
6D	Xpsp3200	43	69	46	0	0	0	2.65	0.27
	Xcfd45	31	89	32	0	0	6	4.46	0.11
7D	Xgwm121	38	79	41	0	0	0	0.11	0.94
	ژنوتیپ‌های مشاهده شده F_2 در نسل نسبت به شتهٔ IIبیوتیپ روسی F_2 genotypes for RWA biotype II	0	0	42	0	116	0	0.21	0.65
	Xbarc126	41	76	41	0	0	0	0.23	0.89

Archive of SID

www.SID.ir

از ژن *Dn7* که در چاودار و بر روی کروموزوم 1R شناسایی شده است). نتایج حاضر نیز نشان داد که ژن مقاومت در لاین CI2401 مشابه ژن‌های *Dn1*، *Dn2*، *Dn5* و *Dn6* بر روی کروموزوم 7D قرار گرفته است. از سوی دیگر با توجه به این‌که ژن *Dn4* که یکی از ژن‌های مقاومت گزارش شده در لاین CI2401 (Dong *et al.*, 1997) بر روی کروموزوم 1D قرار دارد (2005 و 2002 ,Liu *et al.*) نتایج قسمت قبل مبنی بر وجود تنها یک ژن اصلی و غالب کنترل کنندهٔ مقاومت نسبت به بیوتیپ II شتهٔ روسی مورد تایید قرار می‌گیرد چرا که مقاومت نسبت به این بیوتیپ در لاین CI2401 با هیچ‌یک از نشانگرهای مربوط به این کروموزوم پیوستگی نشان نداد (جدول ۳).

بر اساس تحقیقات Dong *et al.* (1997)، Collins *et al.* (2005) و Liu *et al.* (2005 و 2002) ژن‌های مقاومت شناسایی شده نسبت به شتهٔ روسی که بر روی کروموزوم 7D قرار دارند (*Dn1*، *Dn2*، *Dn5* و *Dn6*)، با نشانگر Xgwm121 که یکی از نشانگرهای ریزماهوارهٔ اختصاصی کروموزوم 7D است (http://wheat.pw.usda.gov) پیوستگی دارد. از طرف دیگر با توجه به این‌که بیوتیپ II شتهٔ روسی بر روی ژن‌های مقاومت شناسایی شدهٔ قبلی بر روی کروموزوم 7D از جمله *Dn1*، *Dn2*، *Dn5* و *Dn6* خسارتزا است (Hawley *et al.*, 2003؛ Smith *et al.*, 2004؛ Basky, 2003؛ Puterka *et al.*, 1997)، بنابراین ژن مقاومت موجود در این لاین می‌تواند یک مکان ژنی جدید و نزدیک به ژن‌های قبلی و یا یک آلل جدید القاء کنندهٔ مقاومت نسبت به بیوتیپ II شتهٔ روسی باشد.

هر چند اطمینان از ماهیت و محل دقیق این ژن مقاومت نیاز به مطالعات بیشتر با استفاده از جمعیت‌های پیشرفته‌تر مانند نسل F_3 و تعداد نشانگرهای بیشتری دارد ولی با توجه به مقاومت این ژنوتیپ نسبت به هر دو بیوتیپ I و II شتهٔ روسی (Voothuluru *et al.*, 2006؛ Dong *et al.*, 1997)، تولید ارقام دارای مقاومت پایدار در برابر این آفت با استفاده از این ژنوتیپ در برنامه‌های اصلاحی امیدوارکننده خواهد بود.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از منابع مالی و امکانات آزمایشگاهی و گلخانه‌ای دانشگاه ایالتی کلرادو انجام شد که بدینوسیله از مسئولین این دانشگاه تشکر می‌شود. از Dr. Nora Lapitan، Dr. Junhua Peng و Jeff Rudolph به خاطر کمک در تولید جمعیت مورد استفاده و تکثیر بیوتیپ جدید شتهٔ روسی نیز تشکر می‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir

References

Arzani, A. 2007. Efficiency of markers-assisted selection for a Russian wheat aphid resistance gene in wheat. Seed and Plant 23: 101-112 (in Farsi).

Arzani, A., Peng, J. H., and Lapitan, N. L. V. 2004. DNA and morphological markers for a Russian wheat aphid resistance gene. Euphytica 139: 167–172.

Assad, M. T. 2002. Inheritance of resistance to the Russian wheat aphid in an Iranian durum wheat line. Plant Breeding 121: 180-181.

Basky, Z. 2003. Biotypic and pest status differences between Hungarian and South African populations of Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) (Homoptera: Aphididae). Pest Management Science 59: 1152-1158.

Collins, M. B., Haley, S. D., Peairs, F. B., and Rudolph, J. B. 2005. Biotype 2 Russian wheat aphid resistance among wheat germplasm accessions. Crop Science 45: 1877-1880.

Dong, H., Quick, J. S., and Zhang, Y. 1997. Inheritance and allelism of Russian wheat aphid resistance in several wheat lines. Plant Breeding 116: 449-453.

Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Research 19:1349.

Estakhr, A., and Assad, M. T. 2002. The allelic relationships among Russian wheat aphid genes in Iranian wheat lines and known genes. Journal of Agricultural Science 138: 281-284.

Fouche, A., Verhoeven, R. L., Hewitt, P. H., Walters, M. C., Kriel, C. F., and DeJager, J. 1984. Russian aphid (*Diuraphis noxia*) feeding damage on wheat, related cereals and a *Bromus* grass species, pp. 22-33. In*:* Walters, M. C. (ed.), Progress in Russian Wheat Aphid (*Diuraphis noxia* Mordv.) Research in the Republic of South Africa. Department of Agriculture Technical Communication 191, Republic of South Africa.

Haley, S. D., Peairs, F. B., Walker, C. B., Rudolph, J. B., and Randolph, T. L. 2004. Occurrence of a new Russian wheat aphid biotype in Colorado. Crop Science 44: 1589-1592.

Archive of SID

www.SID.ir

Hawley, C. J., Peairs, F. B., and Randolph, T. L. 2003. Categories of resistance at different growth stages in Halt, a winter wheat resistant to Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). Journal of Economic Entomology 96: 214-219.

Hewitt, P. H., van Niekerk, G. J. J., Walters, M. C., Kriel, C. F., and Fouche, A. 1984. Aspects of the ecology of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia,* in the Bloemfontein district. I. The colonization and infestation of sown wheat, identification of summer hosts and cause of infestation systems. pp. 3-13. In*:* Walters, M. C. (ed.), Progress in Russian Wheat Aphid (*Diuraphis noxia*Mordw.) research in the Re- public of South Africa. Department of Agriculture Technical Communication 191, Republic of South Africa.

Johnson, V. A., Briggle, L.W., Axtell, J. D., Bouman, L. F., Leng, E. R., and Johnson, T. H. 1978. Grain crops. pp. 1-28. In*:* Milner, M. (ed.), Protein Resources and Technology. AVI Publications Co., Westport, CT.

Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M. J., Lincoln, S. E., and Newburg, L. 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations. Genomics 1:174–181.

Liu, X. M., Smith, C. M., and Gill, B. S. 2002. Identification of microsatellite markers linked to Russian wheat aphid resistance genes *Dn*4 and *Dn*6. Theoretical and Applied Genetics 104: 1042-1048.

Liu, X. M., Smith, C. M., Friebe, B. R., and Gill, B. S. 2005. Molecular mapping and allelic relationships of Russian wheat aphid-resistance genes. Crop Science 45: 2273-2280.

Moein-Namini, S., and Amir-Nazari, M. 1995. A Review to Presence and Control of Russian Wheat Aphid. Plant Protection Institute Publications. Tehran, Iran. 39 pp. (in Farsi).

Moharramipour, S., Movahedi, S., Saidi, A., Talebi, A. A., and Fathipour. 2002. Evaluation of resistance to the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), in some advanced wheat lines, Seed and Plant 18: 215-228 (in Farsi).

Najafi Mirak, T., Hosseinzadeh, A., Zali, A., Zeinali, H., Saidi, A., and Rassoilian, G. 2004. Inheritance of resistance to Russian wheat aphlid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), based on leaf rolling in wheat. Seed and Plant 20: 245-257 (in Farsi).

Archive of SID

www.SID.ir

Pike, K. S., Allison, D., Tanigoshi, L. K., Harwood, R. F., Clement, S. L., Halbert, S. E., Smith, C. M., Johnson, J. B., Reed, G. L., and Zwer, P. K. 1991. Russian wheat aphid-biology, damage and management. Pacific Northwest Extension Publications, PNW371.

Prinsloo, G. J. 2000. Host and host instar preference of *Aphelinus* sp.nr. *varipes* (Hymenoptera:Aphelinidae), aparasitoid of cereal aphids (Homoptera: Aphididae) in South Africa. African Entomology 8: 57-61.

Puterka, G. J., Burd, J. D., and Burton, R. L. 1992. Biotypic variation in a worldwide collection of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). Journal of Economic Entomology 85: 1497-1506.

Smith, C. M., Belay, T., Stauffer, C., Stary, P., Kubeckova, I., and Starkey, S. 2004. Identification of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) biotypes virulent to the *Dn*4 resistance gene. Journal of Economic Entomology 97: 1112-1117.

Stoetzel, M. B. 1987. Information on and identification of *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae) and other aphid species colonizing leaves of wheat and barley in the United States. Journal of Economic Entomology 80: 696-704.

Voothuluru, P., Meng, J., Khajuria, C., Louis, J., Zhu, L., Starkey, S., Wilde, G. E., Baker, C. A., and Smith, C. M. 2006. Categories and inheritance of resistance to Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) biotype 2 in a selection from wheat cereal introduction 2401. Journal of Economic Entomology 99: 1854-1861

Walters, M. C., Penn, F., du Toit, F., Botha, T. C., Aalbersberg, K., Hewitt, P. H., and Broodryk, S. W. 1980. The Russian wheat aphid, farming in South Africa, Leaflet Series, Wheat C3, Government Printer, Pretoria.

Webster, J. A., Starks, K. J., and Burton, R. L. 1987. Plant resistance studies with *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae), a new United States wheat pest. Journal of Economic Entomology 80: 944-949.

Wraight, S. P., Poprawski, R. L., Meyer, W. L., and Peairs, F. B. 1993. Natural enemies of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) and associated cereal aphid species in spring-plantedwheat and barley in Colorado. Environmental Entomology 22: 1383-1391.

Archive of SID

www.SID.ir