

بررسی حضور ژن مقاومت به زنگ سیاه Sr2 در ارقام و لاین‌های امید بخش گندم ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی

حبیب اله قزوینی^{۱*}، محسن سرهنگی^۲

۱ و ۲ به ترتیب دانشیار و کارشناس آزمایشگاه، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۱۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۶/۲۸)

Study on presence of stem rust resistance gene Sr2 in the Iranian varieties and elite wheat lines by using molecular markers

Habibollah Ghazvini^{1*}, Mohsen Sarhangi²

1, 2. Associate Professor and Laboratory Technician, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

(Received: May 31, 2016- Accepted: Sep. 18, 2016)

Abstract

Stem rust of wheat caused by *Puccinia graminis* is known as one of the most important and prevalent diseases of wheat worldwide. Deployment of stem rust resistance genes such as *Sr24*, *Sr26*, *Sr31*, *Sr36* and *Sr38* in wheat cultivars in the last decades of 20th century dramatically reduced damaged caused by this disease. One of the durable resistance genes that controlled stem rust during this period was *Sr2* which has been transferred to bread wheat from *Triticum turgidum*. *Sr2* is a non-race specific resistance gene with slow rusting effect which confers resistance at the adult plant stage. In recent years, molecular markers which are tightly linked to *Sr2* have been identified and are widely used in many countries. In this study, presence/absence of *Sr2* in some of the Iranian varieties and elite wheat lines was tested using a SSR marker gwm533, and a CAPS marker. Results indicated that from 188 studied genotypes, only 16 genotypes had linked alleles to *Sr2* genes. Results of this study also showed that the newly identified CAPS marker is more precise marker compared to SSR marker gwm533 to detect *Sr2* gene.

Keywords: Marker assisted breeding, Pyramiding of resistance gene, Adult plant resistance

چکیده

زنگ سیاه گندم (*Puccinia graminis*) به عنوان یکی از مهم‌ترین و رایج‌ترین بیماری‌های گندم در اغلب کشورهای جهان شناخته می‌شود. در دهه‌های آخر قرن بیستم به کار گرفتن تعدادی از ژن‌های مقاومت به زنگ سیاه مانند *Sr24*، *Sr26*، *Sr31*، *Sr36* و *Sr38* در ارقام گندم باعث شد خسارت ناشی از بیماری به طور چشم‌گیری کاهش یابد. یکی از ژن‌هایی که باعث مقاومت پایدار نسبت به زنگ سیاه در این دوره بود، ژن *Sr2* است که از گندم تورجیدوم (*Triticum turgidum*) به گندم معمولی انتقال یافته است. ژن *Sr2* باعث القای مقاومت در مرحله گیاه بالغ می‌گردد و ژنی با مقاومت غیر اختصاصی (Non-race specific resistance) با اثر کاهش بیماری زنگ (Slow rusting) می‌باشد. در سال‌های اخیر، نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن *Sr2* شناسایی شده و در بسیاری از کشورها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این تحقیق حضور ژن *Sr2* در تعدادی از ارقام و لاین‌های امیدبخش گندم کشور با استفاده از یک نشانگر ریز ماهواره gwm533 و یک نشانگر CAPS انجام گردید. نتایج نشان داد که از مجموع ۱۸۸ ژنوتیپ مورد بررسی، آلل‌های پیوسته با ژن *Sr2* در ۱۶ ژنوتیپ وجود داشتند. نتایج این تحقیق همچنین بیانگر این بود که نشانگر جدید CAPS دقت بسیار بالاتری نسبت به نشانگر gwm533 در تعیین ژن *Sr2* در ژنوتیپ‌های گندم دارد.

واژه‌های کلیدی: گزینش به کمک نشانگر مولکولی، هرمی نمودن ژنهای مقاومت، مقاومت مرحله گیاه بالغ.

مقدمه

گندم مهمترین محصول زراعی ایران بوده و در مناطق وسیعی از کشور کشت می‌شود. اهمیت گندم در ایران همانند سایر کشورهای جهان از دو منظر اقتصادی و تغذیه‌ای مورد توجه است. کاشت گندم برای بسیاری از کشاورزان کشور تنها منبع معیشتی خانوار محسوب می‌شود و به همین دلیل این محصول به عنوان مؤلفه مهمی در اقتصاد ملی به شمار می‌آید. از طرف دیگر مردم ایران یکی از بزرگترین مصرف‌کنندگان گندم به ویژه به شکل نان در جهان محسوب می‌شوند. بنا به گزارش سازمان جهانی خواروبار و کشاورزی (FAO) سرانه مصرف گندم در ایران در سال ۲۰۱۴ میلادی ۱۶۶/۳ کیلوگرم بوده که بیش از دو برابر متوسط جهانی است و از این نظر ایران در رتبه ششم جهانی قرار دارد (FAO, 2014). از این رو اهمیت این محصول بعنوان یک محصول راهبردی در تامین قوت غالب مردم و معیشت روزانه افراد جامعه به روشنی آشکار بوده و راهکارهایی که بتوانند ضریب خود اتکایی گندم در کشور را ارتقا دهند همواره مورد حمایت خاص مسئولین و سیاستگذاران بوده است.

تنش‌های محیطی زنده و غیر زنده از عوامل اصلی کاهش معنی‌دار محصول گندم در بسیاری از کشورهای جهان و همچنین بسیاری از مناطق ایران به شمار می‌روند. در میان تنش‌های زنده، سه بیماری مهم زنگ زرد، زنگ قهوه‌ای و زنگ سیاه از گذشته‌های دور باعث خسارت‌های سنگینی به محصول گندم در کشورهای مختلف دنیا بوده‌اند (McIntosh *et al.*, 1995). این بیماری‌های قارچی در کشور ما هم بعنوان عوامل اصلی خسارت‌زا در تولید گندم محسوب می‌شوند (Elahinia, 2005). در بین این بیماری‌ها زنگ سیاه یا زنگ ساقه گندم به عنوان یکی از مهمترین بیماری‌های غلات در اغلب کشورهای جهان شناخته می‌شود. عامل مولد بیماری قارچ (*Puccinia graminis Pers.:Pers.*)

(*f. sp. tritici* Eriks. & E. Henn) بوده که دارای گسترش جغرافیایی بسیار وسیعی است و به طور تاریخی یکی از مشکلات عمده گندم‌کاران در آفریقا، خاورمیانه، مناطق جنوب و جنوب شرق آسیا، استرالیا، زلاند نو، اروپا و اکثر مناطق آمریکای شمالی و جنوبی بوده است (Saari and Prescott, 1985). وقوع این بیماری در ایران برای اولین بار توسط اسفندیاری در سال ۱۳۲۶ گزارش گردید و در حال حاضر در تمام مناطق گندم‌کاری ایران از جمله در استان‌های مجاور سواحل دریای خزر وجود دارد (Elahinia, 2005). علت گسترش بیماری در سال‌های شیوع آن مربوط به باران‌های بهاره و مساعد بودن شرایط جوی در ماه‌های فروردین واردیبهشت است، ولی در اکثر نقاط کشور بروز بیماری در خرداد ماه اتفاق می‌افتد. در مواقع بروز اپیدمی و شیوع بیماری با شدت بالادر بعضی از مناطق دنیا خسارت زنگ سیاه گندم به نحوی است که سنبله‌ها عقیم و پوک شده و فاقد دانه و یا ندرتا دارای دانه‌های بسیار ریز و غیر قابل استفاده می‌باشند (Roelfs *et al.*, 1992).

آخرین اپیدمی زنگ سیاه در قاره آمریکای شمالی که در اوایل دهه ۱۹۵۰ رخ داد باعث نابودی حدود ۴۰٪ از گندم‌های بهاره و حدود ۸۰٪ از گندم‌های دوروم گردید (Peturson, 1958; Stakman and Harrar, 1957). در سال‌های بعد از این اپیدمی، استفاده از ژن‌های موثر مقاوم به زنگ سیاه در برنامه‌های اصلاحی گندم و انتقال آنها به ارقام زراعی باعث شد خسارت ناشی از بیماری به طور بی‌سابقه‌ای کاهش یافته و حتی این گونه استنباط می‌شد که این بیماری در حال ریشه‌کن شدن است. ژن‌های مقاومت *Sr24*، *Sr26*، *Sr31*، *Sr36* و *Sr38* که همگی از طریق خویشاوندان وحشی گندم و یا چاودار زراعی به گندم منتقل شده‌اند و عامل مقاومت در مرحله گیاهچه‌ای هستند از مهمترین ژن‌هایی بودند که باعث دوام مقاومت به زنگ سیاه در سطح جهان

در سال ۱۹۹۸ نژاد جدیدی از زنگ سیاه در کشور اوگاندا با قدرت بیماری‌زایی بر روی ژن *Sr31* مشاهده شد. چون ظهور این نژاد برای اولین بار در سال ۱۹۹۹ در اوگاندا گزارش گردید، این نژاد جدید در دنیا با نام عمومی Ug99 شناخته می‌شود (Pretorius *et al.*, 2000). این نژاد هنوز در حال تکامل بوده و تا کنون چندین نژاد دیگر مشتق شده از نژاد اولیه Ug99 با قدرت‌های بیماری‌زایی متفاوت از نژاد اولیه (بیماری‌زا بر روی ژن‌های *Sr24*، *Sr21* و *Sr36*) شناسایی شده‌اند (Singh *et al.*, 2011b). نژاد Ug99 اولیه با قدرت بیماری‌زایی بر روی گیاهان حامل ژن *Sr31* در سال ۲۰۰۶ با استفاده از سیستم کددهی حروفی تعیین نژاد روتلفز و مارتینز (Roelfs and Martens, 1988) و با استفاده از چهار گروه لاین‌های افتراقی به عنوان نژاد TTKS شناخته شد (Wanyera *et al.*, 2006). نژادهای جدید پاتوژن با قدرت بیماری‌زایی متفاوت از نژاد اولیه در سال‌های ۲۰۰۶ و ۲۰۰۷ در کشور کنیا شناسایی شدند. با اضافه نمودن پنجمین گروه از لاین‌های افتراقی و با استفاده از سیستم کددهی حروفی بین-المللی، نژاد اولیه Ug99 با قدرت بیماری‌زایی بر روی گیاهان حامل ژن *Sr31* به عنوان TTKSK و نژادهای جدید پاتوژن با قدرت بیماری‌زایی بر روی گیاهان حامل ژن‌های *Sr24* و *Sr26* به ترتیب TTKST و TTKSK نام گرفتند (Jin *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2009). نژاد Ug99 همچنان به سیر تکاملی خود در قاره آفریقا ادامه می‌دهد و چهار نژاد جدید مشتق شده از نژاد Ug99 (TTKSF، TTKSP، PTKSK و PTKST) با قدرت بیماری‌زایی متفاوت از نژادهای قبلی در سال‌های ۲۰۰۷ تا ۲۰۰۹ در کنیا، آفریقای جنوبی و اتیوپی شناسایی شده‌اند (Park *et al.*, 2011). وقوع Ug99 (نژاد TTKSK) در سال ۲۰۰۷ برای اولین بار در مناطق شمال غربی ایران و در اطراف بروجرد و همدان گزارش شد (Nazari *et al.*, 2009). با

شدن. یکی دیگر از ژن‌هایی که باعث پایداری مقاومت به زنگ سیاه در دهه‌های پایانی قرن بیستم بود ژن *Sr2* است که از گندم تورجیدوم (*Triticum turgidum*) به گندم معمولی انتقال یافته است (McIntosh *et al.*, 1995). ژن *Sr2* که در سال ۱۹۲۰ توسط مک فادن از گندم امر یاروسلاو (Yaroslav) به گندم زراعی منتقل شده منبع بسیار خوبی برای مقاومت پایدار نسبت به زنگ سیاه بشمار می‌رود. McIntosh *et al.* (1995) معتقدند که *Sr2* یکی از مهمترین ژن‌های کنترل کننده مقاومت به زنگ سیاه می‌باشد. فنوتیپ حاصل از *Sr2* معمولاً به دلیل توارث مغلوب و ماسک شدن با ژن‌های دیگر مقاومت زیاد قابل تشخیص نبوده و تظاهر فنوتیپی آن بیشتر در مرحله گیاه بالغ دیده می‌شود (McIntosh *et al.*, 1995). این ژن با صفت سیاهی دروغین کاه (Pseudo-black chaff) پیوستگی دارد. ژن مقاومت گیاه بالغ *Sr2* به همراه مکان ژنی سیاهی دروغین کاه (PBC) در یک گروه لینکاژی روی قسمت انتهایی (distal region) بازوی کوچک کروموزوم 3B قرار دارند (Singh *et al.*, 2008). در سال‌های اخیر، نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن *Sr2* شناسایی شده و در بسیاری از کشورها مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Hayden *et al.*, 2004; McNeil *et al.*, 2008; Mago *et al.*, 2003; Spielmeyer *et al.*, 2011). این نشانگرها از نوع ریزماهوره و CAPS می‌باشند. Spielmeyer *et al.* (2003) پیوستگی مارکر ریزماهوره gwm533 با ژن *Sr2* را تقریباً ۲ سانتی‌مورگان برآورد کردند. ماگو و همکاران (Mago *et al.*, 2011) نشان دادند که نشانگر CAPS استفاده شده توسط آنها دقت بسیار بالایی در تشخیص ژن *Sr2* داشت. به هر حال، با توجه به این که توسعه این نشانگر بعد از تکثیر توسط PCR نیاز به یک مرحله اضافی هضم با آنزیم برشی *BspHI* دارد هزینه‌های توسعه این نشانگر بیشتر است.

خزانه ژنی تنها ژن‌های *Sr2*، *Sr13*، *Sr14*، *Sr22*، *Sr26*، *Sr28*، *Sr33*، *Sr35*، *Sr42* و *Sr45* مقاومت موثری در برابر حداقل یکی از واریانت‌های نژاد Ug99 داشته‌اند. همچنین حاصل این مطالعات منجر به نامگذاری ۱۲ ژن جدید (*Sr46* تا *Sr57*) و نیز کشف و شناسایی چندین ژن غیرکاتالوگ شده دیگر که احتمالاً این ژن‌ها نیز منابع جدیدی از مقاومت هستند گردیده است (Ghazvini, 2012). ژن‌های مزبور اکثراً دارای مقاومت نسبت به یک و یا چند واریانت نژاد Ug99 می‌باشند و منابع ارزنده‌ای در اصلاح گندم‌های مقاوم به زنگ سیاه خصوصاً نژاد Ug99 در آینده خواهند بود.

از زمان ظهور و گسترش نژاد جدید Ug99 زنگ سیاه با قدرت بیماری‌زایی بر روی کلیه ژن‌های بزرگ اثر موثر استفاده از ژن‌های غیراختصاصی مقاومت به زنگ سیاه در ارقام گندم مورد توجه خاصی قرار گرفته است. نکته قابل توجه در مورد این گونه ژن‌ها اثرات افزایشی این ژن‌ها بوده و جمع کردن تعدادی از این ژن‌ها در ژنوم یک لاین توانسته است واکنش‌های در حد ایمنی کامل و مقاومت پایدار به زنگ‌های مختلف را در این لاین‌ها ایجاد کند (Singh et al., 2011a). همه ژن‌های مقاومت شناخته شده به نژاد Ug99 به غیر از *Sr2* دارای مقاومت خصوصی در هر دو مرحله گیاهچه ای و گیاه بالغ هستند (Singh et al., 2011b). ژن مقاومت گیاه بالغ *Sr2* باعث گسترش تدریجی زنگ (Slow rusting) می‌شود (Sunderwirth and Roelfs, 1980). ترکیب *Sr2* با چند ژن ناشناخته دیگر مقاومت با مکانیزم گسترش تدریجی زنگ که احتمالاً از ارقام تاجر (Thatcher) و کریس (Chris) منشأ گرفته‌اند و با عنوان کمپلکس - *Sr2* شناخته می‌شوند باعث گردیده که مقاومت پایداری نسبت به زنگ سیاه در ژرم‌پلاسما گندم دانشگاه مینسوتا آمریکا، دانشگاه سیدنی استرالیا و گندم بهاره اصلاح شده توسط دکتر بورلاگ در برنامه به‌نژادی سیمیت دیده

توجه به خشکسالی گسترده در ایران در سال ۲۰۰۸ هیچ گزارشی مبنی بر مشاهده بیماری در این سال داده نشد ولی در سال ۲۰۰۹ ظهور نژاد TTKSK در استان خوزستان در جنوب ایران، جایی که گندم‌های بهاره کشت می‌شوند، نیز گزارش شد (Ghazvini, 2012).

با توجه به بیماری‌زایی نژاد Ug99 و سایر نژادهای مشتق شده از نژاد اولیه بر روی اکثر ژن‌های شناخته شده برای مقاومت به زنگ سیاه در مرحله گیاهچه‌ای، این نژادها تهدید و خطر بالقوه‌ای برای تولید جهانی محصول گندم به شمار می‌آیند. اگر چه کنترل شیمیایی بیماری می‌تواند بطور موثری از خسارت پاتوژن به محصول گندم بکاهد و سموم موثری نیز برای کنترل بیماری زنگ سیاه در دسترس می‌باشند، بهترین راه مبارزه بر علیه بیماری استفاده از ژن‌های مقاومت به بیماری در ارقام گندم است. اصلاح ارقام گندم دارای مقاومت ژنتیکی یک روش ترجیحی برای جلوگیری از بروز اپیدمی و کاهش خسارت زنگ سیاه در برنامه‌های به‌نژادی کلیه کشورهایی است که بطور جدی از طرف این بیماری تهدید می‌شوند. تا قبل از وقوع نژاد Ug99 حدود ۴۵ ژن نامگذاری (کاتالوگ) شده و چندین ژن غیر نامگذاری شده در خزانه ژنی ژن‌های مقاومت به زنگ سیاه گندم وجود داشت (Jin et al., 2007; McIntosh et al., 1995). بعد از ظهور نژاد جدید Ug99 و سایر نژادهای مشتق شده از آن تحقیقات گسترده‌ای برای موثر بودن ژن‌های موجود در خزانه ژنی بر علیه نژاد جدید، شناسایی منابع جدید مقاومت و پیدا کردن مارکرهای مولکولی برای ژن‌های موثر موجود در خزانه ژنی و یا ژن‌های تازه کشف شده آغاز شد (Ghazvini et al., 2012a; Ghazvini et al., 2012b; Ghazvini et al., 2013; al., 2010; Jin et al., 2007; Hiebert et al., 2011; Singh et al., 2011b Mago et al., 2011). این مطالعات نشان داد که در بین ژن‌های موجود در

برگ‌های جوان فریز شده با ازت مایع، در هاون چینی کوبیده شده و سپس پودر حاصل به تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل گردید. به هر تیوب ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج CTAB که از قبل تا دمای ۶۵ درجه سانتیگراد گرم شده بود اضافه و کاملاً مخلوط گردید. بافر استخراج کننده شامل ۲٪ مقدار وزن/حجم CTAB، Tris-HCl ۲۰۰ میلی‌مولار با pH=8، EDTA ۲۰ میلی‌مولار با pH=8، NaCl ۱/۴ مولار و ۱٪ مقدار وزن/حجم بتا-مرکاپتواتانول (β -mercapt) بود.

سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب گرم در دمای ۶۵ درجه نگهداری شدند و در طول این مدت بطور مرتب هر ۱۰ دقیقه یک بار تیوب‌ها به آرامی مخلوط شدند. سپس تیوب‌ها با دور ۱۰۰۰۰ و به مدت ۵ دقیقه و در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند تا بقایای سلولی و پروتئین‌ها ته‌نشین گردند. سپس فاز رویی هر تیوب به تیوب دیگری منتقل گردیده و هم حجم فاز رویی از محلول کلروفرم-ایزوامیل الکل (۱:۲۴) که از قبل در یخچال خنک شده بود اضافه گردید. تیوب‌ها چند بار به آرامی مخلوط و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور بالا سانتریفیوژ شدند. فاز رویی را به تیوب جدیدی منتقل کرده و ۳ ماکرولیتر RNase به هر تیوب اضافه نموده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. در مرحله بعد معادل ۰/۱ حجم از فاز رویی محلول استات سدیم ۳ مولار با pH = 5.2 و معادل ۰/۷ حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت نگهداری شدند. در این مرحله تیوب‌ها چند بار به آرامی سروته شدند تا کلاف DNA ظاهر شد. سپس تیوب‌ها با دور ۱۰۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی دور ریخته شد و به هر نمونه ۱ میلی-لیتر الکل ۷۰٪ اضافه شده و با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت با دور ریختن الکل تیوب حاوی رسوب DNA در دمای اتاق خشک شد. سپس میزان ۱۰۰ میکرو لیتر آب مقطر استریل به هر

شود (Singh et al., 2011b).

انتقال ژن‌های موثر مقاومت به زنگ سیاه به ارقام زراعی گندم و هرمی نمودن این ژن‌ها در ژرم‌پلاسما سازگار از دیرباز سیاست موفق‌تری برای کنترل بیماری‌زایی ناشی از نژادهای جدید قارچ بوده است. بر این اساس این تحقیق با هدف بررسی حضور ژن Sr2 در تعدادی از ارقام و لاین‌های امیدبخش گندم کشور با استفاده از نشانگرهای مولکولی انجام گردید. شناسایی حضور این ژن در ارقام تجارتي، لاین‌های امیدبخش و لاین‌های در حال معرفی می‌تواند ابزار مؤثری در اختیار اصلاح‌گران گندم قرار داده تا به وسیله آن تلاقی‌های هدفمندی را در جهت رسیدن به مقاومت پایدار ارقام پایه‌ریزی کنند.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش تعداد ۱۸۸ ژنوتیپ گندم شامل ارقام تجارتي گندم در کشور، لاین‌های امید بخش و لاین‌های کانید معرفی شدن در کلیه اقلیم‌های سرد، معتدل، گرم جنوب، گرم شمال کشور و آزمایشات تحمل به شوری، تعدادی از ارقام و لاین‌های مورد استفاده در بلوک‌های تلاقی (Crossing block) به همراه تعدادی از ارقام بهاره مرکز تحقیقات بین‌المللی سمیت (CIMMYT)، (جدول ۱) با استفاده از نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن Sr2 مورد ارزیابی قرار گرفتند. استخراج دی‌ان‌ا (DNA) ژنومی گیاهان مورد بررسی از برگ‌های سالم و غیر آلوده بر اساس روش CTAB سقای معروف و همکاران (Saghai-Marooft et al., 1984) با کمی تغییرات انجام شد. بدین ترتیب که بذور لاین‌های مورد بررسی پس از ضد عفونی برای آزمون‌های تعیین ژنوتیپ در اتاق رشد کشت شدند و پس از یک هفته و در مرحله دو یا سه برگگی گیاه، نمونه‌های برگگی برداشت و در ازت مایع فریز و بلافاصله عملیات استخراج انجام گردید. جهت استخراج DNA، ابتدا میزان ۰/۱ تا ۰/۱۵ گرم از

تیوب اضافه گردید.

ارزیابی کمی و کیفیت DNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Thermo Electron Corporation Wi53711 و طول موج ۲۶۰ نانومتر و همچنین الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸% انجام شد. سپس غلظت نمونه‌های DNA برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر تنظیم شد. نشانگرهای مورد استفاده بر اساس نتایج مطالعات قبلی در رابطه با نشانگرهای مرتبط با ژن Sr2 انتخاب شدند (Mago *et al.*, 2003; Spielmeyer *et al.*, 2011) توالی آغازگرهای مورد استفاده به شرح زیر بود:

gwm533

Forward 5' - GTT GCT TTA GGG GAA AAG CC -3'

Reverse 5' - AAG GCG AAT CAA ACG GAA TA -3'

csSr2 (CAPS)

Forward 5' -

CAAGGGTTGCTAGGATTGGAAAAC

Reverse 5' -

AGATAACTCTTATGATCTTACATTT
TTCTG

واکنش PCR برای تکثیر نشانگر ریز ماهواره gwm533 براساس روش Spielmeyer *et al.* (2003) و در حجم ۱۵ میکرولیتر برای هر واکنش با استفاده از بافر (1X) PCR، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، یک واحد از آنزیم Taq polymerase، ۰/۲ میلی مولار dNTPs و ۵۰ نانوگرم از DNA هر نمونه و با دستگاه ترموسایکلر Bio Rad T100 انجام شد چرخه‌های دمایی واکنش PCR برای پرایمر gwm533 به صورت زیر بودند: ۱- سیکل اول: ۳ دقیقه و در دمایی ۹۲ درجه سانتی‌گراد برای شروع واشرست‌سازی DNA. ۲- سیکل دوم ۴۷ چرخه و شامل: ۳۰ ثانیه در دمایی ۹۲ درجه، ۳۰ ثانیه در دمایی ۶۲ درجه (دمای

اتصال به صورت Touch Down بوده که در ۷ چرخه اول به ازای هر چرخه یک درجه دما کاسته می‌شود)، ۳۰ ثانیه در دمایی ۷۲ درجه. ۳- سیکل سوم شامل: یک مرحله ۱۰ دقیقه‌ای در دمایی ۷۲ درجه برای تکمیل بسط DNA انجام گرفت. ۴- سیکل چهارم شامل: یک مرحله یک دقیقه‌ای در دمایی ۱۵ درجه برای خنک شدن نمونه‌ها بود. پس از اتمام چرخه‌ها، نمونه‌ها از دستگاه خارج شده و تا قبل از الکتروفورز در دمایی ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس محصولات حاصل از PCR توسط دستگاه الکتروفورز Hoefer SE600 و ژل پلی‌اکریلامید ۶% تفکیک شد. ولتاژ الکتروفورز ۱۰۰ ولت در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از محلول اتیدیوم بروماید ژل‌های مربوطه رنگ‌آمیزی و توسط اشعه UV در دستگاه ژل داکيومنت عکسبرداری شدند و تجزیه و تحلیل و امتیاز بندی باندهای حاصل بر مبنای اندازه باندها در مقایسه با مارکر وزنی (Mass ladder marker) صورت گرفت.

واکنش PCR برای نشانگر csSr2 براساس روش Mago *et al.* (2011) انجام گرفت. چرخه‌های دمایی واکنش PCR برای پرایمر csSr2 به صورت زیر بودند: ۱- سیکل اول ۲ دقیقه و در دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای شروع واشرست‌سازی DNA انجام گرفت. ۲- سیکل دوم ۳۰ چرخه و شامل: ۳۰ ثانیه در دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه در دمایی ۶۰ درجه، ۵۰ ثانیه در دمایی ۷۲ درجه. ۳- سیکل سوم شامل: یک مرحله ۵ دقیقه‌ای در دمایی ۷۲ درجه برای تکمیل بسط DNA انجام گرفت. ۴- سیکل چهارم شامل: یک مرحله یک دقیقه‌ای در دمایی ۱۵ درجه برای خنک شدن نمونه‌ها انجام بود. پس از اتمام چرخه‌ها، نمونه‌ها از دستگاه خارج شده و تا قبل از الکتروفورز در دمایی ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

مخلوط PCR برای پرایمر csSr2 شامل ۵۰ نانوگرم DNA، ۰/۲ میلی مول، ۱۰

یک آلل ۱۲۰ نوکلئوتیدی نشانگر ریز ماهواره gwm533 بر روی کروموزوم 3BS با ژن Sr2 در چندین لاین پیوستگی دارد. آنها فاصله این نشانگر با ژن Sr2 را برابر ۲ سانتی مورگان تعیین کردند. با این وجود تحقیقات بعدی نشان داد که این نشانگر ابزار دقیقی برای شناسایی ژن Sr2 نیست زیرا در روی کروموزوم 3BS یک باند ۱۲۰ نوکلئوتیدی دیگر هم توسط نشانگر ریز ماهواره gwm533 تکثیر می شود که یک آلل با توالی متفاوت از آلل پیوسته با ژن Sr2 بوده و باعث می شود که لاین هایی هم که فاقد ژن Sr2 هستند واجد آن به نظر برسند (Mago et al., 2011). محمدی و همکاران (Mohammadi et al., 2013) اظهار نمودند که از ۶۷ لاین و رقم ایرانی که با نشانگر gwm533 آزمایش شدند بترتیب ۲۲ و ۱۱ ژنوتیپ آلل نول و آلل ۱۵۵ بازی تولید کردند که بطور قطع فاقد ژن Sr2 بودند. این محققین بیان نمودند که در آزمایش آنها تعداد ۳۴ لاین و رقم آلل ۱۲۰ بازی تولید کردند که احتمال وجود ژن Sr2 در این ژنوتیپ ها را نشان می دهد. به هر حال نتایج Patpour و همکاران (۲۰۱۴) نشان می دهد که اکثر ژنوتیپ هایی که در آزمایش انجام شده توسط محمدی و همکاران (Mohammadi et al., 2013) واجد آلل ۱۲۰ بازی بودند در مرحله گیاه کامل واکنش های بسیار حساسی در نچورو در کنیا، تل هادیا در سوریه و کلاردشت و کرج در ایران نشان دادند. با توجه به این که ژن Sr2 در شرایط نرمال بیماری و بدون فشار شدید بیماری (مانند مناطق تل هادیا، کلاردشت و کرج) دارای مقاومت قابل قبولی برای کلیه نژادهای زنگ از جمله نژاد جدید Ug99 است، صرف وجود آلل ۱۲۰ بازی نشانگر gwm533 در ارقام گندم نمی تواند بیانگر قطعیت حضور ژن Sr2 در آن ارقام باشد. مطالعه ماگو و همکاران (Mago et al., 2011) بر روی تعداد زیادی از ارقام و لاین های گندم آمریکای شمالی و سیمیت که فاقد ژن Sr2 ولی واجد آلل

پیکومول از هر پرایمر، کلرید منیزیم ۱/۵ میلی مول، ۰/۵ واحد آنزیم GoTaq Flexi Taq polymerase و بافر GoTaq Flexi (1x) در حجم نهایی ۱۵ میکرو لیتر بود. پنج میکرو لیتر از مواد حاصل از PCR با استفاده از ژل آگارز ۱٪ در دستگاه الکتروفورز افقی تفکیک و رنگ آمیزی باندهای حاصل با استفاده از محلول اتیدیوم بروماید انجام شده و باندهای DNA هر نمونه تحت اشعه ماورا بنفش در دستگاه ژل داکيومنت (UVitech) عکسبرداری شدند.

برای حصول نشانگر CAPS به مقدار ۲/۵ میکرو لیتر از مخلوط زیر به ۱۰ میکرو لیتر باقیمانده مواد حاصل از PCR اضافه شد: ۱/۲۵ میکرو لیتر بافر 10x NEB buffer 4 و ۰/۲۵ میکرو لیتر برشی BspHI (10U/μl; NEB) به اضافه ۱ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر شده استریل. مخلوط حاصل از PCR و آنزیم برشی به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه نگهداری شدند. سپس مواد حاصل با استفاده از ژل آگارز ۲/۵٪ در دستگاه الکتروفورز افقی تفکیک و رنگ آمیزی باندهای حاصل با استفاده از محلول اتیدیوم بروماید انجام شده و باندهای DNA هر نمونه تحت اشعه ماورا بنفش در دستگاه ژل داکيومنت (UVitech) عکس برداری شدند و تجزیه و تحلیل و امتیازبندی باندهای حاصل بر مبنای اندازه باندها در مقایسه با مارکر وزنی (Mass ladder marker) صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به آلل های مرتبط با ژن مقاومت گیاه بالغ Sr2 در ژنوتیپ های ایرانی در جدول یک نشان داده شده اند. از مجموع ۱۸۸ رقم و لاین مورد بررسی ۱۴۱ لاین و رقم دارای آلل ۱۲۰ نوکلئوتیدی برای نشانگر ریز ماهواره gwm533 بودند و سایر ژنوتیپ ها یا دارای آلل ۱۵۰ بازی و یا فاقد هر گونه آللی (آلل نول) بودند (جدول ۱). اسپیل مییر و همکاران (Spielmeyer et al., 2003) گزارش کردند که

هم ۷۵٪ از ژنوتیپ‌های مورد بررسی آلل ۱۲۰ بازی را نشان دادند که رقمی نزدیک به ۷۲٪ Long-Xi و همکاران (۲۰۱۰) می‌باشد. در مجموع ۱۴۱ لاین و رقم مورد بررسی دارای آلل ۱۲۰ نوکلئوتیدی بودند که نشان دهنده خطای بسیار زیاد این نشانگر در بررسی حضور ژن *Sr2* می‌باشد (جدول ۱). نتایج این تحقیق موید نتایج سایر محققین بوده و نشان داد که این نشانگر دارای دقت بالایی در تعیین وجود ژن *Sr2* در ژنوتیپ‌های گندم نیست. Hayden و همکاران (۲۰۰۴) یک مارکر STM را معرفی نمودند که می‌توانست بین دو آلل نشانگر ریز ماهواره gwm533 تمایز ایجاد کند. همچنین، McNeil و همکاران (۲۰۰۸) توانستند سه نشانگر ریز ماهواره جدید را که از نشانگر gwm533 به محل ژن *Sr2* نزدیکتر بودند شناسایی کنند. بهر حال این نشانگرها نیز دارای چند شکلی نسبتاً بالایی در بین لاین‌های مختلف واجد و یا فاقد ژن بودند و به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار نگرفتند.

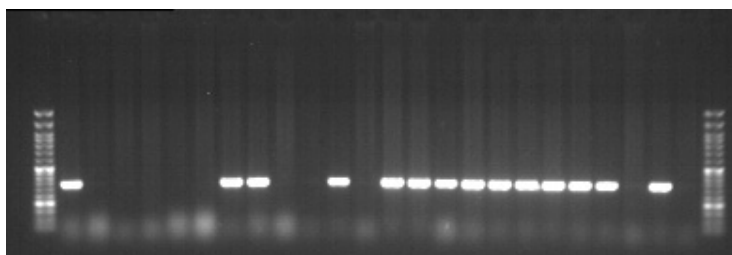
آخرین یافته‌های تحقیقاتی نشان می‌دهند که برای بررسی حضور جایگاه ژنی *Sr2*، نشانگر جدیداً معرفی شده csSr2 دارای دقت بسیار بالاتری است (Mago et al., 2011). این نشانگر از گروه نشانگرهای CAPS به‌شمار می‌آید و دارای پیوستگی بالایی با ژن *Sr2* می‌باشد. مواد حاصل از PCR با پرایمر csSr2 دارای آلل نول یا عدم وجود باند که نشان دهنده عدم حضور ژن *Sr2* بوده و یا یک باند ۳۳۷ نوکلئوتیدی می‌باشند (شکل ۱). باند ۳۳۷ نوکلئوتیدی پس از بریده شدن با آنزیم برشی *BspHI* دو آلل دیگر نشانگر CAPS را تولید می‌کند. الف: آلل تیپ گندم مارکوئیز که شامل دو قطعه ۲۲۵ و ۱۱۲ نوکلئوتیدی بعد از بریده شدن با آنزیم برشی *BspHI* است. این آلل با فقدان ژن *Sr2* همبستگی نشان می‌دهد (شکل ۲). ب: آلل تیپ گندم هوپ که شامل سه قطعه ۱۷۲، ۱۱۲ و ۵۳ نوکلئوتیدی بعد از بریده شدن با آنزیم برشی *BspHI*

۱۲۰ بازی بودند بدگمانی‌ها در مورد استفاده موثر از نشانگر ریز ماهواره gwm533 در برنامه‌های گزینش بر اساس نشانگر (MAS) را افزایش داد. این محققین نشان دادند که از مجموع ۱۲۱ ژنوتیپ مورد بررسی، ۲۰ ژنوتیپ که از لحاظ فقدان ژن *Sr2* ژنوتیپ‌هایی شناخته شده‌اند دارای آلل ۱۲۰ بازی بودند (Mago et al., 2011).

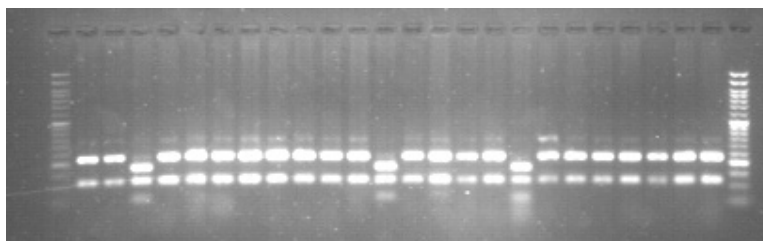
Long-Xi و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه‌ای تنوع هاپلوتایپی مکان‌های ژنی مرتبط با تعدادی از ژن‌های مقاومت به زنگ سیاه را در تعدادی از ارقام گندم سیمیت، ایکاردا و چین ارزیابی کردند و با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره gwm533 و barc133 برای بررسی ژن *Sr2* اظهار داشتند که از ۱۱۵ لاین دریافتی از سیمیت ۸۳ لاین دارای آلل ۱۲۰ بازی برای نشانگر gwm533 و دارای آلل ۱۱۷ بازی برای نشانگر barc133 بودند و به احتمال زیاد حامل ژن *Sr2* هستند. با وجود این که این رقم حدود ۷۲٪ از لاین‌های سیمیت را حامل ژن *Sr2* نشان می‌داد، این محققین اظهار نمودند درصد بالایی ژنوتیپ‌هایی با ژن *Sr2* جای تعجب نیست زیرا ژن *Sr2* بصورت گسترده‌ای در برنامه‌های اصلاحی سیمیت به کار گرفته شده است. به هر حال، نکته قابل توجه در این تحقیق این بود که تعداد زیادی از لاین‌هایی که با استفاده از نشانگر gwm533 احتمال حضور ژن *Sr2* را نشان می‌دادند در آزمایشات مزرعه‌ای در نجویو کشور کنیا عکس العمل‌های از نیمه حساس تا حساس به زنگ سیاه نژاد Ug99 نشان دادند. نکته قابل تامل دیگر در این تحقیق این بود که برخی ژنوتیپ‌ها مانند ژنوتیپ سیمیت-۷۳ (CIMMYT-73) که بر اساس استفاده از نشانگر gwm533 احتمال حضور ژن *Sr2* را نشان می‌دادند علاوه بر حساسیت به زنگ سیاه هیچ نشانه‌ای از والدینی که دارای ژن *Sr2* باشند در شجره خود نداشتند. با استفاده از نشانگر gwm533 در این تحقیق

پرایمر csSr2 یا تولید دوقطعه ۲۲۵ و ۱۱۲ نوکلئوتیدی پس از هضم با آنزیم برشی) با اطمینان ۱۰۰٪ مشخص گردید. تفاوت مشاهده شده مربوط به ارقام و لاین‌هایی بودند که بر اساس فنوتیپ آنها حدس زده می‌شد که حامل ژن Sr2 باشند ولی یا آلل نول داشتند و یا پس از هضم با آنزیم برشی سه قطعه ۱۷۲، ۱۱۲ و ۵۳ نوکلئوتیدی را نشان ندادند (Mago et al., 2011). بهر حال، با توجه به این که توسعه این نشانگر بعد از تکثیر توسط PCR نیاز به یک مرحله اضافی هضم با آنزیم برشی *BspHI* دارد هزینه‌های استفاده از این نشانگر را بیشتر می‌سازد.

است. وجود این آلل نشان دهنده حضور ژن Sr2 در ژنوتیپ مربوطه می‌باشد (شکل ۲). در مجموع می‌توان گفت که نشانگر CAPS دارای سه آلل مختلف ژن Sr2 با دقت بالا می‌باشد. Mago و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که مارکر CAPS استفاده شده توسط آنها دقت بسیار بالایی در تشخیص حضور این ژن دارد. آنها اظهار نمودند که در بین ۱۲۲ ژنوتیپ مورد بررسی این مارکر با اطمینان ۹۵٪ حضور ژن Sr2 را تشخیص داد (تولید سه قطعه ۱۷۲، ۱۱۲ و ۵۳ نوکلئوتیدی پس از هضم با آنزیم برشی)، در صورتی که با استفاده از این نشانگر عدم حضور این ژن (آلل نول بعد از PCR با



شکل ۱. تکثیر یا عدم تکثیر (آلل نول) باند ۳۳۷ نوکلئوتیدی حاصل از PCR با پرایمر csSr2 در تعدادی از ژنوتیپ‌های مورد بررسی



شکل ۲. تشکیل دوقطعه ۲۲۵ و ۱۱۲ نوکلئوتیدی از باند ۳۳۷ نوکلئوتیدی حاصل از PCR با پرایمر csSr2 بعد از بریده شدن با آنزیم برشی *BspHI* (فقدان ژن Sr2) و سه قطعه ۱۷۲، ۱۱۲ و ۵۳ نوکلئوتیدی بعد از بریده شدن با آنزیم (حضور ژن Sr2) در تعدادی از ژنوتیپ‌های مورد بررسی.

آلل‌های ۱۷۲، ۱۱۲ و ۵۳ نوکلئوتیدی نبودند و در میان ۱۸۸ ژنوتیپ مورد بررسی در این تحقیق تنها ۱۶ ژنوتیپ واجد ژن Sr2 بودند. رقم گندم پاریسی دارای دو تکرار در آزمایش بود که در هر دو تکرار حضور ژن Sr2 در این رقم احراز گردید (جدول ۱).

نتایج این تحقیق نشان داد که از مجموع ۱۸۸ ژنوتیپ مورد بررسی ۱۱۷ ژنوتیپ پس از تکثیر با نشانگر csSr2 واجد آلل‌های ۳۳۷ نوکلئوتیدی بودند (جدول ۱). به هر حال، اکثر ارقام و لاین‌های گندم بعد از بریده شدن با آنزیم برشی *BspHI* واجد

پرایمر csSr2 قبل از مرحله برش با آنزیم برشی *BspHI* وجود دارد. بهر حال، در ۸ ژنوتیپ آل ۳۳۷ نوکلئوتیدی تکثیر شده با پرایمر csSr2 مشاهده شد ولی هیچ بانندی (آل نول) با نشانگر gwm533 تکثیر نگردید (جدول ۱). نکته قابل توجه این بود که از بین این ۸ ژنوتیپ، ژنوتیپ شماره ۱۲۰ (MS-89-10) فاقد آل ۱۲۰ نوکلئوتیدی حاصل از نشانگر gwm533 بود در حالی که وجود آل مؤثر ژن *Sr2* در این ژنوتیپ توسط نشانگر مولکولی csSr2 بعد از مرحله برش با آنزیم *BspHI* به اثبات رسید (جدول ۱). در مجموع می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که همبستگی آل‌های ۱۲۰ نوکلئوتیدی نشانگر gwm533 و ۳۳۷ نوکلئوتیدی نشانگر CAPS تصادفی بوده و در مواردی حتی ژنوتیپ‌هایی با ژن *Sr2* وجود دارند که فاقد آل ۱۲۰ نوکلئوتیدی نشانگر gwm533 می‌باشند. عدم همبستگی آل‌های ۱۲۰ نوکلئوتیدی نشانگر gwm533 و ۳۳۷ نوکلئوتیدی نشانگر CAPS در تحقیق انجام شده توسط Mago و همکاران (۲۰۱۰) نیز مشاهده شده است.

اکثر ارقام گندم ایرانی یا به طور مستقیم از ژرم‌پلاسِم سیمیت انتخاب شده اند و یا از تلاقی ارقام و توده های بومی داخلی با این مواد به دست آمده‌اند. به همین دلیل انتظار می‌رفت که تعدادی از ژنوتیپ‌های گندم ایرانی حامل ژن *Sr2* باشند. به غیر از رقم پارسی، سه رقم گندم تجارتي مارون، فلات و زاگرس، چهار لاین مورد استفاده در بلوک های تلاقی (Crossing block)، یک لاین امید بخش اقلیم معتدل، یک لاین امیدبخش متحمل به شوری اقلیم معتدل، سه لاین امید بخش اقلیم سرد و سه رقم بهاره دریافتی از مرکز تحقیقات بین المللی سیمیت (‘Pavon’, ‘Kingbird’, ‘MUU’ and ‘76’) نیز دارای ژن *Sr2* بودند (جدول ۱) و به عنوان منابع بسیار مفیدی در برنامه‌های به نژادی گندم در کشور برای انتقال این ژن به ارقام و لاین‌های دیگر خواهند بود.

این رقم در سال ۱۳۸۸ با توجه به مقاومت مزرعه ای خوب آن به نژاد Ug99 در مرکز تحقیقاتی نجورو کشور کنیا و سایر صفات زراعی مطلوب برای کشت در منطقه معتدل کشور معرفی گردید (Najafian *et al.*, 2010). مقاومت مزرعه‌ای ناشی از ژن *Sr2* به نژاد Ug99 در مرکز تحقیقاتی نجورو کشور کنیا در برخی از ارقام نیمه پا کوتاه گندم سیمیت نظیر Kingbird، Parula، Pavon 76 و Kritati گزارش شده است (Singh *et al.*, 2011b). با توجه به مقاومت قابل قبول رقم پارسی به نژاد Ug99 انتظار می‌رود که حداقل قسمتی از این مقاومت ناشی از ژن *Sr2* باشد. در یک مطالعه ژنتیکی وجود مقاومت به زنگ سیاه در رقم پارسی در اثر ژن *Sr2* همراه با یک ژن ناشناخته دوم در این رقم گزارش شده است (Afshari, 2014).

Long-Xi و همکاران (۲۰۱۰) نیز در تحقیق خود در مورد تنوع هاپلوتایپی مکان‌های ژنی مرتبط با تعدادی از ژن‌های مقاومت به زنگ سیاه در ارقام گندم سیمیت، از سه لاین گندم کینگ برد، پاوون ۷۶ و کریتاتی (‘Kingbird’, ‘Pavon 76’ and ‘Kiritati’) که حضور ژن *Sr2* در آن‌ها قطعیت دارد استفاده نمودند. نتایج آزمایشات مزرعه‌ای در نجورو کشور کنیا نشان داد که هر سه این ژنوتیپ‌ها دارای عکس العمل‌های مقاوم تا نیمه مقاوم به زنگ سیاه نژاد Ug99 بودند. در این آزمایش از ۱۶ ژنوتیپ حامل ژن *Sr2* با استفاده از نشانگر مولکولی csSr2 دو ژنوتیپ مقاوم ارقام گندم کینگ برد و پاوون ۷۶ بودند (جدول ۱). رقم کریتاتی جزو ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این آزمایش نبود. حضور ژن *Sr2* با استفاده از نشانگر CAPS در ارقام کینگ برد و پاوون ۷۶ در این تحقیق تاییدی بر قدرت تشخیصی بالای این نشانگر برای ردیابی ژن *Sr2* می‌باشد.

نتایج نشان دادند که همبستگی بالایی ($r=0.51$) بین حضور آل ۱۲۰ نوکلئوتیدی حاصل از نشانگر gwm533 و آل ۳۳۷ نوکلئوتیدی حاصل از PCR با

جدول ۱. کد برنامه به نژادی و شجره ژنوتیپ های مورد بررسی در تعیین ژن Sr2 با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره Gwm 533 و csSr2 قبل و بعد از برش با آنزیم BspHI

ردیف	کد برنامه	شجره	نشانگر Gwm 533	نشانگر csSr2	نشانگر SNP بعد از برش با آنزیم BspHI
1	ER-90-1	Parsi	1	1	1
2	ER-90-2	Sivand	1	1	0
3	ER-90-3	Pishtaz//Lov24/Coc 75	0	0	0
4	ER-90-4	Pishtaz//Lov24/Coc 75	1	0	0
5	ER-90-5	Pishtaz3/Jup/Bjy"s"/Kauz"s"	1	0	0
6	ER-90-6	Pishtaz//Falat/Barakat	1	0	0
7	ER-90-7	Bow"s"/Vee"s"/1-60-3/3/Cocoraque 75/4/Chamran	0	1	0
8	ER-90-8	4771//Fkn/Gb/3/Vee "s"/Vee "s"/4/Buc "s"/5/1-66-44/6/Nanjing 8343/Kauz	1	1	0
9	ER-90-9	IR/FR (Aldric)	0	0	0
10	ER-90-10	IR/FR (FD03142)	0	0	0
11	ER-90-11	PFAU/MILAN//FISCAL	1	1	0
12	ER-90-12	Gv/Ald "s"/5/Ald "s"/4/Bb/Gll/Cno.../6/Marv	0	0	0
13	ER-90-13	NAC//THAC//3*PVN/3/MIRLO/BUC/4/2*PASTOR	1	1	0
14	ER-90-14	VORB/FISCAL	1	1	0
15	ER-90-15	PRL/2*PASTOR	1	1	0
16	ER-90-16	SHARP/3/PRL/SARA//TSI/VEE#5/5/VEE/LIRA//BOW/3/BCN/4/KAUZ	1	1	0
17	ER-90-17	WAXWING*2/TUKURU	1	1	0
18	ER-90-18	WBL1*2/BRAMBLING	1	1	0
19	WS-86-14	KAUZ/PASTOR	1	1	0
20	WS-87-15	PBW343*2/KUKUNA	1	1	0
21	M-87-16	KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/PASTOR	1	1	0
22	M-88-10	Alvd/Aldan/las*2/3/Bez	1	0	0
23	M-88-16	Alvand//Aldan/las/3/1-73-240/4/Alamoot	1	1	1
24	WS-88-6	Alvd/Aldan/las*2/3/Bez	1	0	0
25	WS-88-13	WAXWING*2/KIRITATI	1	1	0
26	-	Sirvan	1	1	0
27	-	Sivand	1	1	0
28	-	Parsi	1	1	1
29	-	Pishtaz	0	0	0
30	-	Morvarid	1	0	0
31	-	Soisson	0	0	0
32	-	Gascogen	0	0	0
33	-	Gaspard	0	0	0
34	-	MV-17	1	0	0
35	-	Suweon 220	1	0	0
36	-	Sorkhtokhm	0	0	0
37	-	Niknejad	1	1	0
38	-	Maroon	1	1	1
39	-	Kavkaz	1	0	0
40	-	Bezostaya	1	0	0
41	-	Chamran	0	1	0
42	-	1-66-22	0	0	0
43	CB-201	Falat	1	1	1
44	CB-204	Atrak	1	1	0
45	CB-209	Darab#2	1	1	0
46	CB-210	Star"s"	1	1	0
47	CB-212	Nai 60/Hn7//Sy	1	1	0
48	CB-233	ATTILA50Y//ATTILA/BCN	1	1	0
49	CB-235	F60314.78/MRL//CNO79/3/KA/Nac/4/Star	1	1	0
50	CB-267	Zagros	1	1	1
51	CB-273	Debeira	1	1	0
52	CB-406	Rsh2*10120//Zagros	0	0	0
53	CB-410	Hys//Drc*2/7c/3/2*Rsh/4/Zagros	1	1	0
54	CB-419	Baz	1	1	0
55	CB-436	CBRD-3/STORK X DICOCOIDEOS	1	1	0
56	CB-438	OASIS//SKAUZ//4*BCN/3/2*PASTOR	1	1	0
57	CB-440	WAXWING*2/KIRITATI	1	1	0
58	CB-441	Alvd//Aldan/las/3/Flt	1	0	0
59	CB-485	DEZ/SW891882	1	0	0
60	CB-486	DEZ/SW891882	1	1	0
61	CB-487	DEZ/SW891882	1	0	0

ادامه جدول ۱. کد برنامه به نژادی و شجره ژنوتیپ‌های مورد بررسی در تعیین ژن *Sr2* با استفاده از نشانگرهای ریز
ماهواره Gwm 533 و csSr2 قبل و بعد از برش با آنزیم *BspHI*

ردیف	کد برنامه	شجره	نشانگر Gwm 533	نشانگر csSr2	نشانگر SNP بعد از برش با آنزیم <i>BspHI</i>
62	CB-488	CHAMRAN*2//VEE/NAC	1	1	0
63	CB-489	BACANORA T88/PASTOR	1	1	1
64	CB-490	KAUZ*2//OPATA//KAUZ/3//DEEK	1	0	0
65	CB-491	STAR*3//LOTUS-5//GEMMEIZA7	1	1	0
66	CB-238	Tam 200	1	1	0
67	CB-239	Savena	1	1	0
68	CB-241	Fiocco	1	1	0
69	CB-245	Fertillo/Vee#5	1	1	1
70	CB-259	Sefid	1	0	0
71	CB-263	Desconocido-7	1	1	0
72	CB-265	Shahi/Kvz/5/Shahi/4/Kal/Bb/CJ"S"/Hork"s"(1-66-31)	1	1	0
73	CB-268	Pastor	1	1	0
74	CB-269	Vee/Nac	1	1	0
75	CB-278	Chenab	1	1	0
76	CB-284	IRENAB/BABAX//PASTOR	1	1	0
77	CB-314	DH 1 France	1	0	0
78	CB-315	DH 2 France	1	0	0
79	CB-332	Mina	1	1	0
80	CB-349	Croc-1/Aegilops Squarrosa(Taus)//Kauz CLG90...	1	1	0
81	CB-350	Bloudan/3/Bb/7C*2//Y50E/Kal*3/CW 89	1	1	0
82	CB-374	VEE/KOEL	1	1	0
83	CB-376	BOBWHITE #1/FENGKANG 15	1	1	0
84	CB-380	Atrak/Wang shubai	1	1	0
85	CB-383	Berkut	1	1	0
86	CB-385	Milan /Karawan 1//Tajan	1	1	0
87	CB-386	Vorona/Cno79//Kauz/3/Milan	1	1	0
88	CB-401	Atrak/Frontana/Tajan	1	1	0
89	CB-408	Sha7/Kauz//Ning8201/3/Tajan	0	0	0
90	CB-409	Alvd//Aldan"s"/Ias58/4/kal/Bb/Cj"s"/3/Hork"s"	1	1	0
91	N-89-4	TAJAN/3//KAUZ/PASTOR//KAUZ/4//NAI60/HN7//SY	1	1	0
92	N-89-6	TAJAN/ARVAND//TAJAN/3//KOHIDASHT	1	1	0
93	CB-212	Nai 60/Hn7//Sy	0	0	0
94	CB-242	Kauz/Sorkhtokhm	1	1	0
95	CB-248	Karwan 1	1	1	0
96	CB-258	Tabasi	1	0	0
97	CB-262	Rsh*2/10120	0	0	0
98	CB-275	WEEBILL 1	1	1	1
99	CB-280	SAKHA 93	1	1	1
100	CB-287	Kharchia	0	0	0
101	CB-288	Roshan	0	0	0
102	CB-291	Mahooti	0	0	0
103	CB-293	Kavir (Stm/3/Kal//V534/Jit/716)	0	1	0
104	CB-294	Bam	1	0	0
105	CB-295	Nishaboer	0	0	0
106	CB-296	Sistan	0	1	0
107	CB-297	KRL 1-4	1	0	0
108	CB-393	SAKHA 94	1	1	0
109	CB-402	Arg	0	0	0
110	CB-404	GF-gy54/Attila	1	1	0
111	Ms-85-17	Sakha 8/Darab#2//1-66-22	0	0	0
112	Ms-87-8	1-66-22/3/Alvd//Aldan/Ias	0	1	0
113	Ms-87-9	Desprez80/Rsh//1-66-22/Inia	0	0	0
114	Ms-88-8	1-66-22/Passarinho/3/Vee/Nac//1-66-22	1	0	0
115	Ms-88-16	Alborz/5/K62909/4/Cno//K58/Tob/3/Wa/5/Chen...	0	0	0
116	Ms-89-4	Mrm/Catbird	0	0	0
117	Ms-89-6	Alvd//Aldan/Ias 58/3/Kvr	0	0	0
118	Ms-89-7	Gv/D630//Ald"s"/3/Azd/4/Rsh/5//Kauz/Stm	0	0	0
119	Ms-89-8	Chamran/Kavir	0	0	0
120	Ms-89-10	T.AestxTi(La(Frkal.xGb))=(1-66-22)/5//Kauz*2//Opata//Kauz	0	1	1
121	Ms-89-11	T.AestxTi(La(Frkal.xGb))=(1-66-22)/5//SNH.9	0	0	0
122	Ms-89-12	Atrak/3/Chen/Aeg.sq(Taus)//BCN CMBW98, Y5554	0	0	0
123	Ms-8913	Kauz*2//Opata//Kauz/3//Sakha 8/4/Tam 200	0	0	0
124	ER-C-90-1	Oroum	0	0	0
125	ER-C-90-2	Zareh	0	0	0
126	ER-C-90-3	Mihan	1	0	0
127	ER-C-90-4	Zm/Shiroodi/6/Zm/5/Omid/4/Bb/Kal//Ald/3/Y50E/Kal*3//Emu"s"	1	0	0

ادامه جدول ۱. کد برنامه به نژادی و شجره ژنوتیپ های مورد بررسی در تعیین ژن Sr2 با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره Gwm 533 و csSr2 قبل و بعد از برش با آنزیم BspHI

ردیف	کد ژن	شجره	شناگر Gwm 533	شناگر csSr2	شناگر SNP بعد از برش با آنزیم BspHI
128	ER-C-90-5	Owl/Kavir/3/Owl/Vee/Nac	1	1	0
129	ER-C-90-6	Shi4414/Crow"s"/V82187/T.aest/5/Ti/4/La/3/Fr/Kad//Gh/6/2*Bloudan/3/Bb/2*7C//Y50 E/Kal*3	1	1	0
130	ER-C-90-7	Rsh/Tam200//Alvd	1	1	0
131	ER-C-90-8	Alvd//Aldan"s//IAS58/3/MV17/5/Kal/Bb//Cj"s"/3/Hork"s"/4/MV17	1	1	0
132	ER-C-90-9	Akn/81-130ks73h530//Vee/3/Novosadska (Iran-ICARDA)	1	0	0
133	ER-C-90-10	Alpu	1	1	0
134	ER-C-90-11	Eudiele	0	0	0
135	ER-C-90-12	Aldric	0	0	0
136	ER-C-90-13	Fioreetto	1	1	0
137	ER-C-90-14	Fdo 11042	1	1	0
138	C-85-3	Chk"S"/Bow"s"/90Zhcong87/3/Shiroodi	1	1	1
139	C-85-6	MV17/Zm	1	0	0
140	C-86-3	Bloudan/3/Bb/7c*2//Y5OE/3*Kal/4/MV17	1	1	0
141	C-86-5	Yan 7578.128//Chil/2*Stan	1	0	0
142	C-86-6	Yan 7578.128//Chil/2*Stan	1	0	0
143	C-87-6	Alvd//Aldan/Ias*2/3/Gaoland	1	0	0
144	C-87-11	Bazzwood/MV17	1	1	0
145	C-87-12	Bazzwood/MV18	1	0	0
146	C-87-18	Bilinmayen-6	1	1	0
147	C-88-4	Gaocogan/Cal.no.3625//Alboot	1	1	0
148	C-88-7	Rsh*2/10120//Zagroz	1	1	0
149	C-88-13	Gds/4/Anza/3/Pi/nan//Hys/5/Vee/Nac/6/...	1	1	1
150	C-88-14	Gds/4/Anza/3/Pi/nan//Hys/5/Vee/Nac/6/...	1	1	1
151	C-89-6	Fdo2062	0	0	0
152	C-89-7	Zm*2/Gazland	0	1	0
153	C-89-15	Fdo4085	1	1	0
154	N-88_3	Merua//Turaco/Chil/3/Tajan	1	1	0
155	N-88-5	Catbird/Ning8201/4/Blodan/3/BB/7C*2//Y50E/KAL*3/5/Tajan	1	1	0
156	N-88-6	Milan/S87230//Huttes	1	0	0
157	N-88-20	Milan/Attila//Attila-4Y	1	1	0
158	N-89-3	Kauz//Kauz/Star/3/Shanghai#3/4/Nai60/HN7//SY	1	1	0
159	N-89-4	Tajan/3/Kauz/Pastor//Kauz/4/Nai60/HN7//SY	1	1	0
160	N-89-5	Shiroodi/Desconcido-7//Shiroodi	0	0	0
161	N-89-6	Tajan/Arvand//Tajan/3/Kohdasht	1	1	0
162	S-87-20	Oasis/Skauze//4*bcn/3/2*Pastor	1	1	0
163	S-87-18	CBRG-3/Stork X Dicoccoides	1	1	0
164	CIMMYT-1	Avocet-YrA	0	0	0
165	CIMMYT-2	Cacuke #1	0	1	0
166	CIMMYT-3	Sujata	0	0	0
167	CIMMYT-4	New pusa 876	1	0	0
168	CIMMYT-5	Kenya kongoni	1	1	0
169	CIMMYT-6	Kundan	1	0	0
170	CIMMYT-7	Weebill1*2/ Brambling	1	1	0
171	CIMMYT-8	Francolin #1	1	1	0
172	CIMMYT-9	Babax/ Lr42//Babax*2/3/Kuruku	1	1	0
173	CIMMYT-10	Fret2/Tukuru//Fret2	1	1	0
174	CIMMYT-11	Quaiu #3	1	1	0
175	CIMMYT-12	Avocet-YrA/Rl6077	0	0	0
176	CIMMYT-13	MUU	1	1	1
177	CIMMYT-14	Danphe #1	1	1	0
178	CIMMYT-15	Kingbird	1	1	1
179	CIMMYT-16	Pavon-76	1	1	1
180	PR-27	W3918A/Jup//Gru90-201736/3/Moghan1/Falat	1	1	0
181	PR-25	Dh1 france	1	0	0
182	PR-26	Dh1 france	1	0	0
183	MS-90-13	Pishtaz//Karchia	1	0	0
184	MS-90-15	Pishtaz//Karchia	0	0	0
185	CB/SN 215	Moghan 3	1	1	0
186	CB/SN 202	Shiroodi	1	1	0
187	CB/EM 47	Shiraz	1	0	0
188	Moroko	Moroko	1	1	0

جمع باندهای مشاهده شده 141 113 17

می‌دهد که نشانگر csSr2 از دقت بسیار بالایی برای شناسایی ژن Sr2 برخوردار بوده و می‌تواند بهتر از صفت مورفولوژیکی سیاهی دروغین کاه در انتخاب ژنوتیپ‌هایی با ژن Sr2 به کار گرفته شود. از دیگر مزایای این نشانگر انتخاب با اطمینان زیاد در مراحل اولیه رشد گیاه و قبل از مرحله گیاه بالغ می‌باشد که می‌تواند برای انجام تلاقی‌های هدفمند به منظور انتقال ژن Sr2 بسیار مفید واقع شود. با توجه به شکسته شدن مقاومت ژن Sr31 و حضور نژاد TTKSK در بعضی مناطق کشور، استفاده از ژن‌های مقاومت بیشتر در ژرم‌پلاسم گندم داخلی ضروری بوده و وارد نمودن ژن‌های مقاومت غیر اختصاصی مانند Sr2 در ارقام جدید گندم، سبب پایداری بیشتر مقاومت نسبت به نژاد Ug99 زنگ سیاه در کشور خواهد شد. به هر حال باید توجه داشت که این ژن به تنهایی قادر به ایجاد مقاومت قابل قبولی در ژنوتیپ‌های گندم نبوده و هر می‌تواند این ژن با سایر ژن‌های مقاومت به زنگ سیاه می‌تواند به عنوان راهکار مناسبی برای ایجاد مقاومت پایدار به زنگ سیاه در ارقام تجاری گندم باشد.

REFERENCES

- Afshari (2014) Determination of number of resistance genes to stem rust Disease (*Puccinia graminis* f.sp. *tritici*), rtace Ug99 in two wheat cultivars. *Agricultural Biotechnology* 4: 27-33.
- Elahinia SA (2005) Crop diseases and their control. University of Gilan Presse. 638 p.
- FAO (2014) OECD-FAO Agricultural Outlook 2014, Wheat projections: Consumption, food use, per capita (DOI :10.1787/agr_outlook-2014-en). Retrieved from: http://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2014/statistical-annex_agr_outlook-2014-16-en in March 8th, 2016.
- Ghazvini H (2012) Emergence and current status of Ug99 races of

اصلاح کلاسیک ژن Sr2 به خاطر ماهیت مغلوب این ژن و بروز فنوتیپ آن فقط در مرحله گیاه کامل، که تحت تاثیر محیط و زمینه ژنتیکی ارقام گندم است، مشکل است. نشانگر مورفولوژیکی سیاهی دروغین کاه (PBC) که یک صفت نسبتا غالب است، مدت‌های مدیدی است که در برنامه‌های اصلاحی گندم برای گزینش ژن Sr2 استفاده می‌شود. صفت سیاهی دروغین کاه باعث رنگ سیاه در پوشینه‌ها، پدانکل، و قسمت تحتانی میان گره‌ها می‌شود ولی میزان تظاهر این صفت شدیداً به ژنوتیپ و اثر متقابل آن با محیط وابسته است (Singh, et al., 2008). این صفت تحت شرایط مرطوب خصوصا در مناطق مرتفع بروز می‌کند و تظاهر شدید این صفت در یک ژنوتیپ به عنوان صفتی نامطلوب تلقی شده و باعث حذف لاین‌های اصلاحی می‌شود (Singh et al., 2008). به هر حال، لاین‌هایی که این صفت در آنها به میزان بسیار ناچیزی تظاهر می‌یابد نیز شناسایی شده‌اند و انتخاب همزمان ژن Sr2 و مقادیر جزئی این صفت امکان‌پذیر است. نتایج این تحقیق نشان

Puccinia graminis f. sp. *tritici* and overview of recent progresses in deployment of stem rust resistance genes for effective control of disease (keynote presentation). Proceedings Of 12th Congress of Agronomy and Plant Breeding, Karaj, September 4-6, 2012.

- Ghazvini H, Hiebert CW, Zegeye T, Liu S, Dilawari M, Anderson JA, Rouse MN, Jin Y, Fetch T (2012a) Inheritance of resistance to Ug99 stem rust in wheat cultivar Norin 40 and genetic mapping of Sr42. *Theor. Appl. Genet.* 125: 817-824.
- Ghazvini H, Hiebert CW, Zegeye T, Fetch T (2012b) Inheritance of stem rust resistance derived from *Aegilops triuncialis* in wheat line Tr129. *Can. J. Plant Sci.* 92: 1037-1041.

- Ghazvini H, Hiebert CW, Thomas JB, Fetch T (2013) Development of a multiple bulked segregant analysis (MBSA) method used to locate a new stem rust resistance gene (*Sr54*) in the winter wheat cultivar Norin 40. *Theor. Appl. Genet.* 126(2): 443-449.
- Hayden MJ, Kuchel H, Chalmers KJ (2004) Sequence tagged microsatellites for the Xgwm533 locus provide new diagnostic markers to select for the presence of stem rust resistance gene *Sr2* in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 109: 1641-1647.
- Hiebert CW, Fetch TG, Zegeye T (2010) Genetics and mapping of stem rust resistance to Ug99 in the wheat cultivar Webster. *Theor. Appl. Genet.* 121: 65-69.
- Jin Y, Singh RP, Ward RW, Wanyera R, Kinyua M, Njau P, Fetch T, Pretorius ZA, Yahyaoui A (2007) Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic Sr gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis.* 91: 1096-1099.
- Jin Y, Szabo L, Pretorius ZA, Singh R, Ward R, Fetch T (2008) Detection of virulence to resistance gene *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis.* 92: 923-926.
- Jin Y, Szabo L, Rouse M, Fetch JT, Pretorius ZA, Wanyera R, Njau P (2009) Detection of virulence to resistance gene *Sr36* within race TTKS lineage of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis.* 93: 367-370.
- Long-Xi Y, Sixin L, Anderson JA, Singh RP, Yue J, Dubcovsky J, Brown-Guidera G, Bhavani S, Morgounov A, Zhonghu H, Huerta-Espino J, Sorrells ME (2010) Haplotype diversity of stem rust resistance loci in uncharacterized wheat lines. *Mol. Breeding.* 26: 667-680.
- Mago R, Brown-Guedira G, Dreisigacker S, Breen J, Jin Y, Singh R, Appels R, Lagudah ES, Ellis J, Spielmeyer W (2011) An accurate DNA marker assay for stem rust resistance gene *Sr2* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 122: 735-744.
- McIntosh RA, Wellings CR, Park RF (1995) Wheat rusts: an atlas of resistance genes. CSIRO Publications, East Melbourne.
- McNeil MD, Kota R, Paux E, Dunn D, McLean R, Feuillet C, LD, Kong X, Lagudah E, Zhang JC, Jia JZ, Spielmeyer W, Bellgard M, Appels R (2008) BAC-derived markers for assaying the stem rust resistance gene, *Sr2*, in wheat breeding programs. *Mol. Breeding* 22: 15-24 .
- Mohammadi M, Torkamaneh D, Patpour M (2013) Seedling stage resistance of Iranian bread wheat germplasm to race Ug99 of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis.* 97: 387-392.
- Najafian G, Amin H, Afshari F, Rajaei S, Nikzad AR (2010) Parsi, a new bread wheat cultivar, resistant to stem rust (race Ug99) with good bread making quality for cultivation under irrigated conditions of temperate regions of Iran. *Seed and Plant Improvement Journal.* 26 (2): 289-292.
- 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.
- Park R, Fetch T, Hodson D, Jin Y, Nazari K, Prashar M, Pretorius Z (2011) International surveillance of wheat rust pathogen: progress and challenges. *Euphytica.* 179: 109-117.
- Patpour M, Nazari K, Alavi SM, Mousavi A (2014) Detection of resistance sources to Iranian prevalent stem rust races in commercial wheat cultivars. *Seed and Plant Improvement Journal* 30 (1): 133-154.
- Peturson B (1958) Wheat rust epidemics in western Canada in 1953, 1954, and 1955. *Can. J. Plant Sci.* 38: 16-28.

- Pretorius ZA, Singh RP, Wagoire WW, Payne TS (2000) Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* in Uganda. *Plant Dis.* 84: 203.
- Roelfs AP, Martens JW (1988) An international system of nomenclature for *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology.* 78: 526-533.
- Roelfs AP, Singh RP, Saari EE (1992) *Rusts Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management.* Mexico, D.F. CIMMYT.
- Saari EE, Prescott JM (1985) World distribution in relation to economic losses. In *The Cereal Rusts, Vol II: Diseases, Distribution, Epidemiology, and Control*, ed. AP Roelfs, WR Bushnell, pp. 259-98. Orlando, FL: Acad. Press.
- Saghai-Marooif MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA sepaer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 8014-8019.
- Singh RP, Hodson DP, Huerta-Espino J, Jin Y, Bhavani S, Njau P, Herrera-Foessel S, Singh PK, Singh S, Govindan V (2011b) The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49: 13.1-13.17.
- Singh RP, Hodson DP, Huerta-Espino J, Jin Y, Njau P, Wanyera R, Herrera-Foessel SA, Ward WR (2008) Will stem rust destroy the world's wheat crop? *Adv. Agron.* 98: 271-309.
- Singh RP, Huerta-Espino S, Bhavani SA, Herrera-Foessel D, Singh PK, Singh G, Velu RE, Mason Y, Jin P, Njau J (2011a) Race non-specific resistance to rust diseases in CIMMYT spring wheats. *Euphytica.* 179: 175-186.
- Spielmeier W, Sharp PJ, Lagudah ES (2003) Identification and validation of markers linked to broad-spectrum stem rust resistance gene *Sr2* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Sci.* 43: 333-336 .
- Stakman EC, Harrar JG (1957) *Principles of plant pathology.* Ronald Press. New York.
- Sunderwirth SD, Roelfs AP (1980) Greenhouse evaluation of the adult plant resistance of *Sr2* to wheat stem rust. *Phytopathology.* 70: 634-637.
- Wanyera R, Kinyua MG, Jin Y, Singh RP (2006) The spread of stem rust caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, with virulence on *Sr31* in wheat in Eastern Africa. *Plant Dis.* 90: 113.