Archive of SID

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال ششم، شماره پانزدهم، پائیز ۱۳۹۵ (۸۳-۶۹)

Crop Biotech.
Autumn (2016) 15: 69-83.

ردیابی ژن‌های مقاومت به بیماری زنگ سیاه Sr_{42}، Sr_{26} و $SrTr_{6A}$ در نتاج ارقام گندم بهار و پیشتاز با استفاده از گزینش برمبنای نشانگرهای مولکولی

فرشاد بختیار[۱]، حبیب‌اله قزوینی[۲]، مصطفی آقایی سربرزه[۳]، فرزاد افشاری[۳]، عزت‌الله فرشادفر[٤]، محسن سرهنگی[٥] و اسمعیل ابراهیمی‌میمند[٥]

۱. دانشجوی سابق دوره دکتری اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران و استادیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران
۲. دانشیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران
۳. استاد موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران
٤. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
٥. کارشناس موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٥/٦/۱۱- تاریخ تصویب: ۱۳۹٥/۹/۲۱)

Detection of stem rust resistance genes Sr_{42}, Sr_{26} and $SrTr_{6A}$ in progeny of wheat cultivars Bahar and Pishtaz using marker assisted selection

Farshad Bakhtiar[1], Habibollah Ghazvini[2], Mostafa Aghaee Sarbarzeh[3], Farzad Afshari[3] and Ezatollah Farshadfar[4] Mohsen Sarhangi[5] and Esmaeail Ebrahimi Meymand[5]

1. Former Ph.D. Student, Department of Crop Production and Plant Breeding, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran & Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Agriculture Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2. Associate Professor, Seed and plant Improvement Institute, Agriculture Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
3. Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Agriculture Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4. Professor, Department of Crop Production and Plant Breeding, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran
5. Researcher, Seed and plant Improvement Institute, Agriculture Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
(Received: Sep. 2, 2016 - Accepted: Dec. 12, 2016)

Abstract

Cereal rusts are the most important wheat diseases in Iran and worldwide. One of the most effective control measures of these diseases is deployment of resistant cultivars. The objective of this study was identification of stem rust resistance genes and pyramiding these genes in wheat cultivars Bahar and Pishtaz. For this purpose, initially the virulence of eighteen isolates of stem rust that had been collected from several parts of Iran was studied in cultivars/lines Bahar, Pishtaz, Eagle, AC Cadillac and Tr129. Results showed that cultivars AC Cadillac, Eagle, and Tr129 with Sr_{42}, Sr_{26} and $SrTr_{6A}$ genes had good levels of resistance to all evaluated isolates. In order to transfer resistance genes to Bahar and Pishtaz cultivars, after initial and complementary crosses the F_1 seedling resulted were evaluated for their resistance to stem rust and consequently the progeny of complementary crosses were screened for presence or absence of resistance genes using molecular markers. For Sr_{26} gene, primers Sr26#43 and BE518379; for Sr_{42} gene, primer STS (FSD-RSA); and for $SrTr_{6A}$ gene, primers GPW2295 and GPW4032 that showed polymorphism between parents were used to detect presence or absence of resistance genes. Using the seedling test in green house and also detection of molecular markers, it was found that for progeny of complementary crosses in cultivar Bahar transfer of resistance genes Sr_{26}, Sr_{42} and $SrTr_{6A}$ have been successfully completed, and in Pishtaz based on distinctive ability of markers used, at least transfer of two genes of three genes in progenies was proved.

Keywords: Wheat, Disease, Stem rust, Molecular marker.

چکیده

زنگ‌های غلات از مهم‌ترین بیماری‌های گندم در ایران و اکثر مناطق جهان می‌باشند. یکی از مؤثرترین روش‌های کنترل این بیماری‌ها استفاده از ارقام مقاوم است. این تحقیق با هدف شناسایی ژن‌های مقاومت به بیماری زنگ سیاه و هرمی کردن آنها در ارقام گندم بهار و پیشتاز انجام شد. برای این منظور، ابتدا بیماری‌زایی ۱۸ جدایه عامل زنگ سیاه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور بر روی ارقام Eagle، AC Cadillac، Tr129، بهار و پیشتاز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ارقام Eagle, AC Cadillac و لاین Tr129 با دارا بودن ژن‌های Sr_{42}، Sr_{26} و $SrTr_{6A}$ نسبت به اکثر نژادهای مورد بررسی مقاوم بودند. برای انتقال ژن‌های مقاومت به ارقام بهار و پیشتاز، پس از انجام تلاقی‌های اولیه و تکمیلی، گیاهچه‌های F_1 حاصل نسبت به بیماری زنگ سیاه ارزیابی شدند و با استفاده از نشانگرهای مولکولی حضور و یا عدم حضور ژن‌های مقاومت به بیماری در نتاج تلاقی‌های تکمیلی مورد شناسایی قرار گرفت. برای تشخیص ژن Sr_{26} از آغازگرهای Sr26#43 و BE518379، برای شناسایی ژن Sr_{42} از آغازگر Srcad از نوع STS (FSD_RSA) و برای شناسایی ژن $SrTr_{6A}$ از آغازگرهای Gpw2295 و Gpw4032 که در بین والدین چندشکلی نشان داده بودند استفاده شد. با انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای و نشانگرهای مولکولی مشخص شد که در تعدادی از نتاج رقم بهار انتقال ژن‌های مقاومت Sr_{26}، $SrTr_{6A}$ و Sr_{42} با موفقیت کامل صورت گرفته است. همچنین با توجه به توان تشخیص نشانگرهای مورد استفاده انتقال حداقل دو ژن از سه ژن مورد بررسی در نتاج رقم پیشتاز به اثبات رسید.

واژه‌های کلیدی: گندم، بیماری، زنگ سیاه، نشانگر مولکولی.

* نویسنده مسئول:
E-mail: f_bakhtiar2002@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بروز بیماری‌های زنگ در ارقام زراعی غلات، تأثیر قابل ملاحظه‌ای در توسعه تمدن بشر داشته و همواره موجب بروز خسارت‌های جبران ناپذیری شده است. در این رابطه می‌توان به خسارت ناشی از زنگ‌های غلات در ایالات متحده آمریکا طی سال‌های ۱۹۱۸ تا ۱۹۶۷ (بالغ بر ۵۰٪ محصول) و یا خسارت ناشی از زنگ سیاه در سال‌های همه‌گیری (با بیش از ۵۰٪ محصول) اشاره کرد (Roelfs, 1978). در ۱۹۵۴ یک همه‌گیری همزمان زنگ ساقه و زنگ قهوه‌ای گندم باعث بروز خسارتی بالغ بر ۵۰۰ میلیون دلار در کانادا و امریکا شد (Knott, 1989). در اروپا نیز دو همه‌گیری متوسط زنگ ساقه گندم، یکی در سال ۱۹۶۲ در چک و اسلواکی و دیگری در سال ۱۹۶۰ در پرتقال گزارش شده است (Roelfs, 1985). در ایران نیز تا به حال دو همه‌گیری بیماری زنگ سیاه طی سال‌های ۱۳۴۵ در مناطق شمالی و شمال غرب با خسارت بسیار زیاد در برخی مزارع (Sharif *et al*., 1970) و ۱۳۵۵ در مناطق جنوبی و جنوب شرقی کشور با خسارت بالغ بر ۹۰٪ محصول گزارش شده است (Bamdadian and Torabi, 1978).

تاکنون ژن‌های Sr_2,Sr_{26},Sr_{31} و Sr_{36} به عنوان ژن‌های مقاوم به بیماری زنگ سیاه در جهان مورد شناسائی قرار گرفته و جهت ایجاد مقاومت به زنگ سیاه در گندم از آنها استفاده شده است. براساس بررسی‌ها و تحقیقات انجام شده در سال ۱۹۹۸ تیپ جدیدی از زنگ سیاه در اوگاندا مشاهد شد که روی ژن‌های مقاومت Sr_{31} و Sr_{38} که سایر نژادها روی آنها بیماری‌زایی نداشتند، بیماری‌زا بود. این نژاد در سال ۱۹۹۹ به دنیا معرفی شد و چون در اوگاندا نامگذاری شده بود نام آن را UG99 گذاشتند، ژن Sr_{31} با جابجایی کرموزومی 1BL:1RS بین گندم و چاودار، به گندم منتقل شده است و تا قبل از ۱۹۹۸ برای این ژن بیماری‌زایی گزارش نشده بود (Pretorius *et al*., 2000). این نژاد جدید در مدت کوتاهی توانست به کشورهای مجاور اوگاندا منتقل شود. نژاد UG99 بعد از اوگاندا در سال ۲۰۰۲ در کنیا و در سال ۲۰۰۳ از اتیوپی گزارش شد. در سال ۲۰۰۷ به شمال سودان و یمن منتقل گردید و در همین سال، بنابر اعلام موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر و تأیید نمونه‌ها توسط مراجع ذی‌صلاح بین المللی در ایران نیز (مناطق بروجرد و همدان) گزارش شد (Nazari *et al*., 2009). تحقیقات بین‌المللی در کنیا و اتیوپی نشان داد که بیشتر واریته‌های گندم به نژاد UG99 حساس هستند. ژن Sr_{31} به طور وسیعی در گندم‌های سراسر دنیا بخصوص در شبه قاره هند، اروپا و آمریکای جنوبی وجود دارد. در تحقیقات انجام شده در مرکز بین المللی سیمیت از بین ۵۰ ژن آزمون شده تنها ۱۰ نمونه، مقاومت کمی نشان دادند که این مقدار در کمتر از ۱ درصد ارقام کشت شده وجود داشته است (Singh *et al*., 2011).

یکی از روش‌های تولید ارقام مقاوم به بیماری‌های غلات هرمی‌کردن ژن‌های مقاومت است. در این روش ابتدا منابع مقاومت شناسایی شده و سپس به رقمی سازگار و پر محصول منتقل می‌شوند. روش انتقال ژن از گونه‌های وابسته به گندم به مقدار زیادی به فاصله تکاملی بین گونه‌های درگیر بستگی دارد. گونه‌های وابسته به مخزن ژن اولیه گندم معمولی از ژنوم‌های مشابه‌ای سهم می‌برند. این گروه شامل توده‌های بومی *T. aestivum* L.، فرم‌های وحشی و زراعی *T. turgidum* L. و گونه‌های بخشنده ژنوم‌های A و D گندم *T. monococcum* L. یا واریته‌های *boeoticum, urartu, Aegilops tauschii* Coss می‌باشند. انتقال ژن از این گونه‌ها با دورگ‌گیری مستقیم، نوترکیبی هومولوگ‌ها، تلاقی برگشتی و انتخاب انجام‌پذیر است. بسیاری از ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها و آفات با این روش‌ها منتقل شده‌اند و برخی از آنها تا بحال در بهبود واریته‌ها مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند (Mcintosh, 1991). دومین منبع ژن گندم‌های معمولی شامل

www.SID.ir

Archive of SID

گونه‌های پلی‌پلوییید تریتیکوم و آجیلوپس است که حداقل دارای یک ژنوم مشابه با *T. aestivum* L. می‌باشند. انتقال ژن از این گونه‌ها چنانچه که ژن هدف بر روی کروموزوم مشابه قرار داشته باشد به وسیله نوترکیبی ژنوم‌های مشابه امکان پذیر است. این گروه اغلب شامل گونه‌های تتراپلوییید *T. timopheevii* Zhuk می‌باشند. گونه‌های وابسته به سومین منبع ژن دارای وابستگی کمی هستند. کروموزوم‌های آنها با کروموزوم‌های گندم هومولوگ نیستند. جفت شدن کروموزوم‌ها و نوترکیبی آنها در گندم‌های معمولی به مقدار زیادی تحت تأثیر ژن Phi واقع در بازوی بلند کروموزوم 5B که مطمعناً تنها کروموزوم هومولوگ قادر به جفت شدن و نوترکیبی است می‌باشد (Riley and Chapman, 1985; Sears and Okamoto, 1958; Sears, 1976).

استفاده از منابع ژنی مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده موجود در خویشاوندان وحشی و انتقال آنها به ارقام زراعی معمولاً با انتقال صفات زراعی نامطلوب همراه است و منجر به کشش لینکاژی زیان‌آور می‌شود. به منظور حذف این پدیده، در انتقال ژن‌های مقاومت از خویشاوندان وحشی به ارقام زراعی گندم باید سعی کرد تا حد امکان قطعات کروموزومی جابجا شده از اندازه کوچکی برخوردار باشند (Lukaszewski, 2000). یکی دیگر از چالش‌های موجود در انتقال ژن‌های مقاومت از خویشاوندان وحشی پدیده کوتولگی انبوه علفی است. در برخی از مواقع هنگامی که ارقام خاصی از گندم با هم تلاقی داده می‌شوند در نسل F_1 گیاهان کوتاه قد و یا علف‌های انبوه تولید می‌شوند. گندم‌های کوتاه انبوه علفی با کاهش قد و قامت، افزایش تعداد پنجه و کاهش قدرت تولید مثل شناسایی می‌شوند (Mcvetty *et al*., 1976). این تحقیق با هدف شناسایی ژن‌های مقاومت به بیماری زنگ سیاه و بررسی نحوه ردیابی آنها با استفاده از گزینش بر مبنای نشانگرهای مولکولی در نتاج حاصل از ارقام زراعی گندم نان بهار و پیشتاز اجرا شد.

مواد و روش‌ها

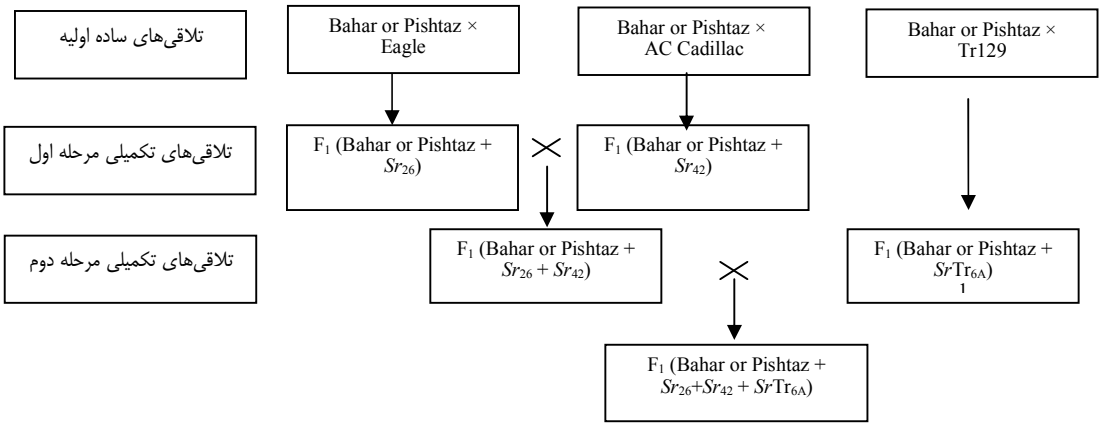
مواد گیاهی مورد استفاده در این بررسی شامل ارقام Eagle (دارای ژن مقاومت Sr_{26})، AC Cadillac (دارای ژن مقاومت Sr_{42})، لاین Tr129 (دارای ژن مقاومت $SrTr_{6A}$) و ارقام زراعی بهار و پیشتاز (حساس به بیماری زنگ سیاه) بودند. در این تحقیق ابتدا بیماری‌زایی ۱۸ جدایه عامل بیماری زنگ سیاه گندم جمع آوری شده از مناطق مختلف کشور، روی ارقام فوق مورد بررسی قرارگرفت. برای تعیین میزان بیماری‌زایی هر جدایه ابتدا تعداد ۶ عدد بذر از ارقام گندم مورد نظر به همراه رقم حساس McNair 701 در دو تکرار و در گلدان‌هایی با قطر ۱۰ سانتی‌متر که حاوی خاک با نسبت ۸۰٪ پیت ماس و ۲۰٪ خاک مزرعه بود مورد کشت قرار گرفتند و در گلخانه با دمای ۲۰–۱۸ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. گیاهچه‌ها در مرحله دو تا سه برگی مایع زنی شدند و به مدت ۲۴ ساعت در اتاق تاریک با دمای ۲۰–۱۸ درجه سانتی گراد و رطوبت بالا (در حد اشباع) قرار گرفتند. سپس گلدان‌ها به گلخانه با دمای ۲۵–۲۲ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند و به منظور حفظ رطوبت بالا از در پوش‌های شفاف استفاده شد. با گذشت ۷–۶ روز بعد از مایع زنی به تدریج علائم ظهور بیماری روی گیاهچه‌های مایع زنی شده آشکار شد و در روز چهاردهم نسبت به انجام یادداشت‌برداری بر اساس مقیاس صفر تا چهار Stakman و همکاران (۱۹۶۲) اقدام شد (۲–۰ واکنش مقاومت و ۴–۳ به عنوان واکنش حساسیت در نظر گرفته شد).

برای جمع‌کردن ژن‌های مقاومت به بیماری زنگ سیاه ساقه گندم در ارقام بهار و پیشتاز ابتدا بذور والدین مورد نظر در سه تاریخ کاشت با فاصله زمانی ۱۵ روز و در هر تاریخ کاشت تعداد ۱۰ عدد بذر از هر رقم پس از ضدعفونی در پتری دیش کاشته شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

پس از تولید جوانه گیاهچه‌های گندم به گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۱۰ سانتی متر که حاوی مخلوطی از خاک برگ، ماسه و خاک مزرعه به نسبت ۱-۱-۲ بود منتقل و در گلخانه با شرایط دمایی ۲۰ – ۱۸ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تا مرحله تولید سنبله و انجام سایر مراحل آزمایش نگه‌داری شدند. پس از خارج شدن ۲/۳ سنبله گندم از غلاف برگ پرچم نسبت به عقیم نمودن گلچه‌های والد مادری اقدام شد و یک الی دو روز بعد، گرده افشانی در تلاقی‌های ساده، تکمیلی مرحله اول و تکمیلی مرحله دوم به شرح شکل (شماره ۱) با والد پدری مورد نظر صورت گرفت. بذور حاصل از هر برنامه دورگ گیری جداگانه برداشت شدند و در مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل ۱. نمایش شماتیک تلاقی‌های انجام شده

برای انجام ارزیابی مقاومت به بیماری زنگ سیاه در نتاج حاصل از تلاقی‌های تکمیلی اولیه، ابتدا بذور F_1 حاصل از آنها به همراه والدین و رقم حساس McNair 701 در گلدان‌های کوچک با قطر ۳ سانتی متر مورد کشت قرار گرفتند. چهارده روز پس از مایع زنی واکنش گیاهچه‌ها نسبت به عامل بیماری زنگ سیاه (جدایه ۱۰-۹۲) با استفاده از روش Stakman و همکاران (۱۹۶۲) مورد ارزیابی قرار گرفت و از بوته‌های مقاوم به بیماری در تلاقی‌های تکمیلی، جهت آزمون نشانگرهای مولکولی نمونه برگ گرفته شد.

به منظور شناسایی و ردیابی ژن‌های مقاومت به بیماری با استفاده از نشانگرهای مولکولی ابتدا با استفاده از روش CTAB استخراج DNA از برگ‌های جوان انجام شد (Saghai-maroof *et al*., 1984). وضعیت DNA استخراج شده از نظر خصوصیات کمی و کیفی شامل غلظت، شکستگی و وجود یا عدم وجود RNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۵ میکرو لیتر برای هر واکنش با استفاده از PCR Buffer (1X)، آغازگرهای هر یک از سه ژن مورد بررسی (۲۰۰ nM)، آنزیم تگ پلیمراز (۱ unit)، dNTPs به میزان ۰/۲ mM، $MgCL_2$ به میزان ۲ mM و DNA به میزان ۴۰ ng برای هر واکنش انجام شد. برنامه حرارتی PCR به صورت یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال با توجه به دمای اتصال نشانگرها به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم شد. سپس محصولات حاصل از PCR بسته به نوع

www.SID.ir

Archive of SID

نشانگر بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و یا پلی‌آکریلامید ۶ درصد تفکیک شدند و با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و توسط اشعه UV در دستگاه ژل داکیومنت مورد عکس برداری قرار گرفتند. نمره دهی آلل‌ها توسط مقایسه با مارکر وزنی و کنترل‌های مثبت و منفی به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) انجام شد و به منظورگروه بندی نتاج حاصل از تلاقی‌های تکمیلی مرحله دوم بر اساس حضور و یا عدم حضور ژن‌های مقاومت به بیماری زنگ سیاه Sr_{26}، Sr_{42} و SrTr از تجزیه کلاستر به روش پیوستگی بین گروه‌ها (UPGMA) استفاده شد.

نتایج و بحث

بررسی بیماری زایی جدایه‌های عامل بیماری زنگ سیاه گندم جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور روی ارقام Eagle، AC Cadillac، Tr129، بهار، پیشتاز و شاهد حساس مکنیر نشان داد که کلیه نژادهای جمع‌آوری‌شده روی رقم حساس مکنیر دارای واکنش حساسیت با شدت ۴ بودند. ارقام Eagle, AC Cadillac و لاین Tr129 نسبت به اکثر نژادهای مورد بررسی مقاوم بودند، ولی لاین Tr129 نسبت به دو نژاد عامل بیماری زنگ سیاه واکنش نیمه مقاوم نشان داد (جدول ۱). با توجه به نتایج بررسی واکنش ارقام و لاین‌های گندم ایرانی نسبت به نژاد Ug99 در کشور کنیا مبنی بر حساسیت ارقام بهار و پیشتاز نسبت به این نژاد، آزمایش انجام شده نشان داد که رقم بهار به تعداد زیادی از نژادهای بومی زنگ سیاه مقاوم بوده و بر روی آن بیماری‌زایی مشاهده نشد. متاسفانه رقم پیشتاز که در حال حاضر جزء ارقام غالب اقلیم معتدل کشور می‌باشد نسبت به کلیه نژادهای محلی و نژاد Ug99 حساس بود. آخرین تحقیقات انجام شده در خصوص فراوانی آلل‌های مؤثر در مقاومت به بیماری زنگ سیاه در ایران نشان دهنده این واقعیت است که فراوانی این آلل‌ها در ژرم‌پلاسم گندم‌های ایرانی پائین بوده و در نتیجه، ژرم‌پلاسم گندم ایران در مقابل جدایه‌های زنگ سیاه از کمترین سطح ایمنی برخوردار است (Najafian *et al*., 2010; Mohamadi *et al*., 2013; Patpour *et al*., 2014). کشف و انتقال ژن‌های جدید مقاومت به بیماری‌ها در ارقام زراعی و خویشاوندان وحشی گندم و هرمی نمودن ژن‌های مقاومت در ژرم‌پلاسم سازگار از دیر باز روش موفقی در کنترل بیماری‌زایی نژادهای جدید قارچ‌ها بوده و انتظار می‌رود که در آینده نیز به عنوان یک راه کار اصلی در کنترل بیماری‌ها به‌کار گرفته شود.

در نتیجه می‌توان اطمینان داشت که با استفاده از ارقام Eagle, AC Cadillac و لاین Tr_{129} به عنوان والد دهنده ژن‌های مقاومت Sr_{26}، Sr_{42} و SrTr$_{6A}$ در برنامه‌های به‌نژادی، لاین‌های تولید شده علاوه بر نژاد Ug99 نسبت به نژادهای بیماری‌زای بومی ایران نیز مقاوم خواهند بود، و این ارقام گزینه‌های مناسبی برای هرمی کردن ژن‌های مقاومت به بیماری زنگ سیاه ساقه گندم در ژرم‌پلاسم گندم‌های ایرانی هستند. علی رغم مقاومت ژن Sr_{42} به نژادهای بومی ایران، Ghazvini و همکاران (۲۰۱۲) اظهار نمودند که نژادهای آمریکای شمالی و کانادا بر روی این ژن بیماری‌زایی دارند. نتایج این آزمایش همچنین نشان داد که واکنش ژن Sr_{26} نسبت به جدایه‌های بومی ایران قابل قبول می‌باشد. به نظر می‌رسد که از بین جدایه‌های مورد بررسی جدایه شماره ۱۷ از شدت بیماریزایی بیشتری نسبت به سایر جدایه‌ها برخوردار است. همچنین با توجه به نتایج آزمایش مشخص شد که جدایه شماره ۸ ضعیف ترین بیماری‌زائی را نسبت به ارقام مورد مطالعه دارد. ارقام بهار و پیشتاز نسبت به جدایه‌های ۲، ۱۴ و ۱۵ واکنش حساسیت نشان دادند.

به منظور جمع‌کردن ژن‌های مقاومت به بیماری زنگ سیاه ساقه گندم در ارقام بهار و پیشتاز تلاقی‌های مورد نظر به شرح (جدول ۲) در گلخانه انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. واکنش جدایه‌های مختلف زنگ سیاه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور بر روی ارقام گندم Eagle، AC Cadillac، Tr129، بهار و پیشتاز

جدایه	رقم					
	Eagle	Tr129	AC Cadillac	بهار	پیشتاز	McNair701
1	1	2 C N	2 C	4	4	4
2	O;	;1	O;	2^{+}	4	4
3	1	3	;	1	4	4
4	O;	O;	O;	;1	3	4
5	;1	2^{+}	O	;1	4	4
6	;1	2^{+}	O;	;1	3	4
7	;1	;1	O	6PO,5P3	3^{+}	4
8	O;	O	O;	O;	1^{+}	4
9	;1	;1	O;	O	3	4
10	1CN	;1	2	3	3	4
11	;1	;1	O;	O;	O	4
12	;1	;1	O	2	3	4
13	;1	;1	O	;1	3	4
14	;1	;	O;	3	4	4
15	;1	;1	;1	4	4	4
16	;1	1	O	2	4	4
17	1	2CN	2CN	4	4	4
18	1	3	O	;1	4	4

جدول ۲. تلاقی‌های ساده، تکمیلی مرحله اول، تکمیلی مرحله دوم، تعداد بذر تولید شده و درصد موفقیت

شجره	تعداد سنبله تلاقی داده شده	تعداد بذر F1 تولید شده	درصد موفقیت
Bahar/AC Cadillac	6	120	%100
Bahar/Eagel	6	54	%45
Bahar/Tr 129	6	60	%50
Pishtaz/ AC Cadillac	6	100	%83.33
Pishtaz/Eagel	6	100	%91.66
Pishtaz/Tr 129	6	55	%45.83
Bahar/AC Cadillac// Bahar/Tr 129	6	36	%30
Pishtaz/Eagel//Pishtaz/ AcCadillac	6	90	%75
Bahar/AC Cadillac// Bahar/Tr129/3/Bahar/Eagel	23	197	%42.83
Pishtaz/Eagel//Pishtaz/ ACCadillac/3/Pishtaz/Tr129	13	118	%45.38

در رقم بهار ابتدا شش تلاقی ساده با هر یک از ارقام گندم Eagle، AC Cadillac و لاین Tr129 انجام شد که به ترتیب ۵۴ ، ۱۲۰ و ۶۰ عدد بذر F_1 از هر کدام از تلاقی‌ها به‌دست آمد. بذور تولید شده پس از برداشت جهت انجام تلاقی‌های تکمیلی مرحله اول در گلخانه مورد کاشت قرار گرفتند و تعداد شش تلاقی با شجره Bahar/ACCadillac//Bahar/Tr 129 انجام شد. در این مرحله تعداد ۳۶ عدد بذر تولید شد که پس از انجام ارزیابی مقاومت به بیماری زنگ سیاه در گیاهچه‌های حاصل و استفاده از آزمون نشانگرهای مولکولی تعداد ۷ گیاهچه F_1 حامل ژن‌های مقاومت Sr_{42} و $SrTr_{6A}$ تشخیص داده شدند. سپس با انجام ۲۳ تلاقی تکمیلی در مرحله دوم تعداد ۱۹۷ بذر با شجره Bahar/ACCadillac//Bahar/Tr129/3/ Eagel. Bahar/ تولید شد که با انجام آزمایش نشانگرهای مولکولی وجود ژن‌های Sr_{26}، $SrTr_{6A}$ و Sr_{42} در سه تا از نتاج F1 تولید شده به اثبات رسید.

www.SID.ir

Archive of SID

در رقم پیشتاز نیز ابتدا شش تلاقی ساده با هر یک از ارقام گندم Eagle، AC Cadillac و لاین Tr129 انجام شد که به‌ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰و ۵۵ عدد بذر F_1 از هر کدام از تلاقی‌ها به‌دست آمد. بذور تولید شده پس از برداشت جهت انجام تلاقی‌های تکمیلی مرحله اول در گلخانه مورد کاشت قرار گرفتند و تعداد شش تلاقی با شجره Pishtaz/Eagel//Pishtaz/ACCadillac انجام شد. در این مرحله تعداد ۹۰ عدد بذر تولید شد که پس از انجام ارزیابی مقاومت به بیماری زنگ سیاه در گیاهچه‌های حاصل و استفاده از آزمون نشانگرهای مولکولی تعداد ۱۶ گیاهچه F_1 حامل ژن‌های مقاومت Sr_{42} و Sr_{26} تشخیص داده شدند. سپس با انجام ۱۳ تلاقی تکمیلی در مرحله دوم تعداد ۱۱۸ بذر با شجره Pishtaz/Eagel//Pishtaz/ACCadillac/3/ Pishtaz/Tr129. تولید شد که با انجام آزمایش نشانگرهای مولکولی وجود حداقل دو ژن از ژن‌های Sr_{26}، $SrTr_{6A}$ و Sr_{42} در تعدادی از نتاج F1 تولید شده به اثبات رسید.

نتایج ارزیابی مقاومت به بیماری زنگ سیاه در گیاهچه‌های F_1 حاصل از اولین مرحله تلاقی‌های تکمیلی در (جدول ۳) ارائه شده است.

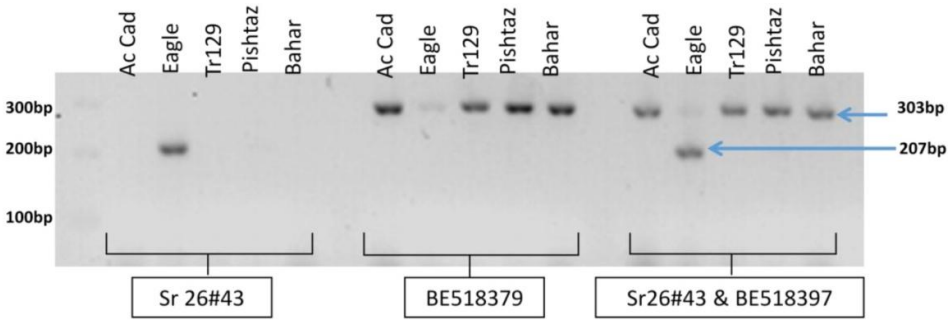
ژن مقاومت به زنگ سیاه Sr_{26} از گونه *Thinopyron ponticum* به کروموزوم شماره 6AL گندم هگزاپلوئید منتقل شده است (Knott, 1961). ژن Sr_{26} مقاومت مؤثری در مقابل نژاد بیماری‌زای Ug99 دارد. این ژن توسط رقم زراعی Eagle در برنامه به‌نژادی گندم استرالیا و سپس دنیا مورد استفاده قرار گرفت. ژن Sr_{26} از جمله ژن‌های معدودی است که می‌تواند در مقابل نژاد مخرب(TTKSK) Ug99 (که حتی توانسته است بر روی گیاهان حامل ژن مقاومت Sr_{31} بیماری‌زائی داشته باشد) و در مقابل نژاد مشتق از آن (TTKST) (که می‌تواند بر روی گیاهان حامل ژن مقاومت Sr_{24} بیماری‌زائی داشته باشد) مقاومت ایجاد کند (Liu *et al*., 2009). رقم ایگل در سال ۱۹۷۱ در کشور استرالیا تولید شد و دارای ژن Sr_{26} به‌عنوان تنها منبع مقاومت به‌کار برده شده در ارقام استرالیایی می‌باشد (Mcintosh, 1988). جهت تشخیص ژن Sr_{26} در ژنوتیپ‌های گندم از روش پیشنهادی Liu و همکاران (۲۰۰۹) استفاده شد. در این روش دو نشانگر اس.تی.اس از نوع غالب در کنار همدیگر مورد استفاده قرار گرفتند که یکی حضور ژن و دیگری عدم حضور ژن را گزارش می‌نماید. این دو نشانگر در کنار هم نقش یک نشانگر مولکولی از نوع همبارز را ایفا می‌کنند. این نشانگرهای مولکولی Sr26#43 و BE518379 نام دارند. نشانگر Sr26#43 حضور آلل مؤثر Sr_{26} را با تکثیر قطعه‌ای با اندازه bp ۲۰۷ گزارش می‌نماید. همزمان، نشانگر BE518379 عدم حضور آلل مؤثر Sr_{26} را با تکثیر قطعه‌ای به اندازه bp۳۰۳ گزارش می‌کند. نشانگرهای هم بارز در تشخیص پایه‌های هموزیگوت از هتروزیگوت بسیار سودمند هستند. بر اساس نتایج حاصل از این بررسی تنها از دی.اِن.اِ رقم استرالیائی Eagle محصول PCR به اندازه bp ۲۰۷ تکثیر شد (شکل ۲) که نشانه حضور آلل مؤثر Sr_{26} بود در صورتی که از دی.اِن.اِ سایر ارقام محصول PCR با اندازه bp ۳۰۳ تکثیر شد که نشانه عدم حضور آلل مؤثر Sr_{26} بود.

جدول ۳. نتایج ارزیابی مقاومت به بیماری زنگ سیاه در گیاهچه های F_1 حاصل از اولین مرحله تلاقی تکمیلی

شجره	تعداد گیاهچه ارزیابی شده نسبت به بیماری زنگ سیاه	تعداد گیاهچه مقاوم	تعداد گیاهچه حساس
Bahar/AC Cadillac// Bahar/Tr 129	23	21	2
Pishtaz/Eagel//Pishtaz/ AC Cadillac	60	39	21

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲. ژل آگارز ۱/۵ درصد برای جایگاه ژنیSr_{26} با نشانگرهای مولکولیSr26#43 و BE518379 شامل: M- مارکر 100bp و شماره‌های ۱- AC Cadillac، ۲- Eagle، ۳- Tr129، ۴- پیشتاز و ۵- بهار.

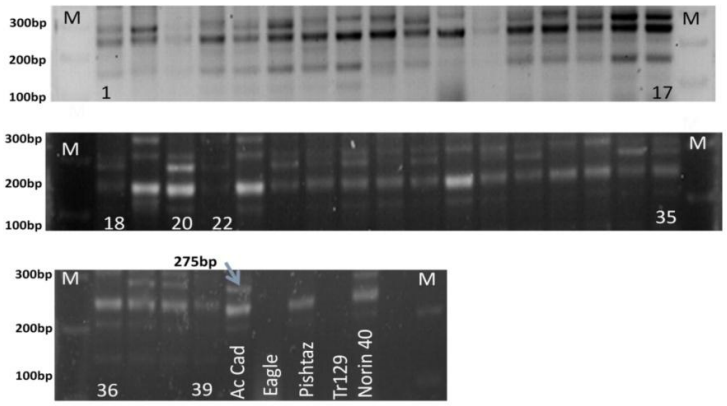
برای تشخیص حضور ژن Sr_{26} در نتاج حاصل از تلاقی‌ها، با انجام آزمایش گلخانه‌ای مقاومت به بیماری زنگ سیاه در مرحله گیاهچه‌ای، از شماره-های مقاوم به بیماری نمونه برگی گرفته شد. پس از استخراج دی.ان.اِ از نمونه‌ها، با استفاده از آغازگر های Sr26#43 و BE518379 پی.سی.آر صورت گرفت، پس از الکتروفورز و تجزیه و تحلیل ژل‌ها، شماره‌های مقاوم به بیماری که دارای ژن Sr_{26} بودند جهت انجام تلاقی‌های تکمیلی انتخاب شدند. ژن مقاومت *Srcad* ، بر روی کروموزوم 6DS واریته‌های کانادایی گندم AC Cadillac و Peace وجود دارد. این ژن به تنهایی دارای مقاومت متوسط به نژادهای گروه Ug99 است ولی هنگامی که با ژن مقاومت Lr34 همراه باشد دارای مقاومت بالایی به نژادهای این گروه خواهد بود (Hiebert *et al*., 2010). مطالعه بر روی رقم نورین۴۰ نشان داد که *Srcad* همان Sr_{42} می‌باشد (Ghazvini *et al*., 2012). برای تعیین حضور ژن Sr_{42} در لاین‌ها و ارقام مورد بررسی در این تحقیق از هشت نشانگر مولکولی استفاده شد که با توجه به نتایج، آغاز گرهای Gpw7292، Cfd135 و Gpw4375 بین والدین بهار، پیشتاز و AC Cadillac چندشکلی نشان نداد در نتیجه استفاده از این آغازگرها برای شناسایی ژن Sr_{42} در این تحقیق ادامه نیافت. در آغازگر Cfd49 بین ارقام بهار و AC Cadillac چند شکلی مشاهده شد در نتیجه از این آغازگر می‌توان در شناسایی ژن Sr_{42} در نتاج حاصل از تلاقی بهار و AC Cadillac استفاده کرد. در این بررسی تنها آغازگر Srcad از نوع STS (FSD_RSA) بین رقم AC Cadillac و هر دو والد بهار و پیشتاز چند شکلی نشان داد و سایر نشانگرها فاقد هرگونه چند شکلی قابل استفاده بودند. در (شکل ۳) قطعه حاصل از PCR دی.ان.اِ رقم AC Cadillac با استفاده از آغازگر FSD_RSA نشان داده شده است که در آن قطعه‌ای به اندازه ۲۷۵ bp تکثیر شده است.

ژن مقاومت به زنگ سیاه $SrTr_{6A}$ در نتیجه ترانسلوکیشن از گونه *Aegilops triuncialis* (2n_4x_28, CCUU) به ناحیه انتهایی کروموزوم شماره 6AS گندم هگزاپلویید منتقل شده است (Aung and Kerber, 1994). تاکنون بر روی این بازوی کروموزومی فقط آلل‌های ژن Sr_8 یعنی Sr_{8a} و Sr_{8b} که هیچکدام نسبت به نژادهای لینه Ug99 مقاومت نداشته‌اند شناسایی شده است. این ژن به صورت غالب موجب القاء مقاومت به نژاد MCCF در لاین Tr129 می‌شود (Ghazvini *et al*., 2012). نکته قابل توجه در مورد این ژن، مقاومت مؤثر آن در

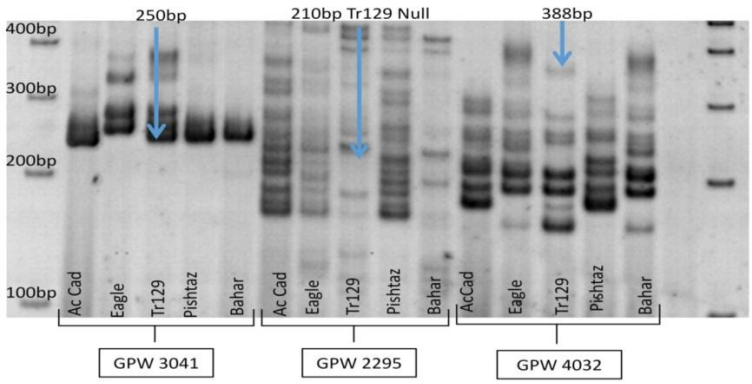
www.SID.ir

Archive of SID

مقابل نژاد بیماری‌زای Ug99 است. آزمایشات مزرعه ای در ایستگاه تحقیقاتی نجورو کنیا نشان داد که این لاین دارای مقاومت بسیار خوبی به نژادهای لینه Ug99 است (Fetch and Zegeye 2009). برای شناسایی ژن $SrTr_{6A}$ در لاین‌ها و ارقام مورد بررسی در این تحقیق از پنج نشانگر SSR استفاده شد که در آغازگرهای Gwm334، Gpw2295 و Gpw4032 بین لاین Tr129 و هر دو والد بهار و پیشتاز چندشکلی مشاهده شد و در آغازگرهای GWM459 و GPW3041 چندشکلی مشاهده نشد (شکل ۴).



شکل ۳. ژل آگاروز ۱/۵ درصد برای جایگاه ژنی Sr_{42} با نشانگر مولکولی Srcad و در نتاج حاصل از تلاقی Pishtaz/Eagle// Pishtaz/AC Cadillac



شکل ۴. ژل پلی آکریل آمید ۶ درصد برای جایگاه ژنی SrTr با نشانگرهای مولکولی Gpw 3041 ، Gpw 2295 و Gpw 4032 شامل: M– مارکر 100bp و شماره های ۱– AC Cadillac، ۲– Eagle، ۳– Tr129، ۴– پیشتاز و ۵– بهار.

برای تشخیص حضور ژن $SrTr_{6A}$ در نتاج حاصل از تلاقی‌ها، پس از انجام آزمایش گلخانه‌ای، از شماره‌های مقاوم به بیماری جهت استخراج دی.ان.ا نمونه برگی گرفته شد و با استفاده از آغازگر Gpw 2295 پی.سی.آر صورت گرفت. با انجام الکتروفورز و تجزیه و تحلیل ژل‌ها، شماره‌های مقاوم به بیماری که دارای ژن $SrTr_{6A}$ بودند جهت انجام تلاقی‌های تکمیلی انتخاب شدند. در بررسی جمعیت نتاج حاصل از تلاقی‌های تکمیلی مرحله دوم رقم پیشتاز با شجره Pishtaz/Eagel//Pishtaz/AcCadillac/3/ Pishtaz/ Tr129 از ۳۲ شماره مورد بررسی شش شماره دارای ژن‌های Sr_{42} و $SrTr_{6A}$، سه شماره دارای ژن‌های Sr_{26} و Sr_{42} و یک شماره دارای ژن‌های Sr_{26} و $SrTr_{6A}$ بودند. ژنوتیپی که حاوی هر سه ژن مورد

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی باشد، مشاهده نشد. در این جمعیت می‌توان با توجه به ژن‌های منتقل شده نسبت به برنامه‌ریزی و ادامه یک تلاقی تکمیلی دیگر اقدام کرد. در بررسی جمعیت حاصل از تلاقی‌های تکمیلی مرحله دوم رقم بهار با شجره Bahar/AcCadillac//Bahar/ Tr129/3/Bahar/ Eagel از ۲۲ شماره مورد بررسی دو شماره دارای ژن‌های Sr_{42} و $SrTr_{6A}$، دو شماره دارای ژن‌های Sr_{26} و Sr_{42} و چهار شماره دارای ژن‌های Sr_{26} و $SrTr_{6A}$ بودند، همچنین در این سری از تلاقی‌ها تعداد سه شماره دارای هر سه ژن مورد بررسی Sr_{26}، $SrTr_{6A}$ و Sr_{42} بودندکه نشان‌دهنده موفقیت کامل در انتقال این سه ژن به ریخته ارثی رقم بهار می‌باشد، که می‌توان با انجام حداقل سه بک‌کراس در این شماره‌ها با رقم بهار و ردیابی ژن‌های مورد نظر با استفاده از نشانگرهای مولکولی به نتاجی با ریخته ارثی بهار و دارای ژن‌های مورد نظر دست یافت. با استفاده از تجزیه کلاستر به روش پیوستگی بین گروه‌ها (UPGMA) و پس از رسم خط برش از فاصله ۱۲، نتاج حاصل از تلاقی‌های تکمیلی مرحله دوم بر اساس حضور و یا عدم حضور ژن‌های مقاومت به بیماری زنگ سیاه Sr_{26} ، Sr_{42} و $SrTr_{6A}$ در هشت گروه به شرح زیر تقسیم‌بندی شدند (شکل ۵).

گروه اول شامل ارقام بهار و پیشتاز و نتاجی که هیچ یک از ژن‌های مورد بررسی به آنها منتقل نشده بود.

گروه دوم شامل نتاج حاصل از ارقام بهار و پیشتاز با ژن $SrTr_{6A}$.

گروه سوم شامل نتاج حاصل از ارقام بهار و پیشتاز با ژن‌های Sr_{26} و $SrTr_{6A}$.

گروه چهارم شامل نتاج حاصل از ارقام بهار و پیشتاز با ژن Sr_{26}.

گروه پنجم شامل نتاج حاصل از رقم بهار و هر سه ژن مورد بررسی Sr_{26}، $SrTr_{6A}$ و Sr_{42}.

گروه ششم شامل نتاج حاصل از ارقام بهار و پیشتاز با دو ژن $SrTr_{6A}$ و Sr_{42}.

گروه هفتم شامل نتاج حاصل از ارقام بهار و پیشتاز با ژن‌های Sr_{26} و Sr_{42}.

گروه هشتم شامل نتاج حاصل از رقم پیشتاز و ژن Sr_{42}.

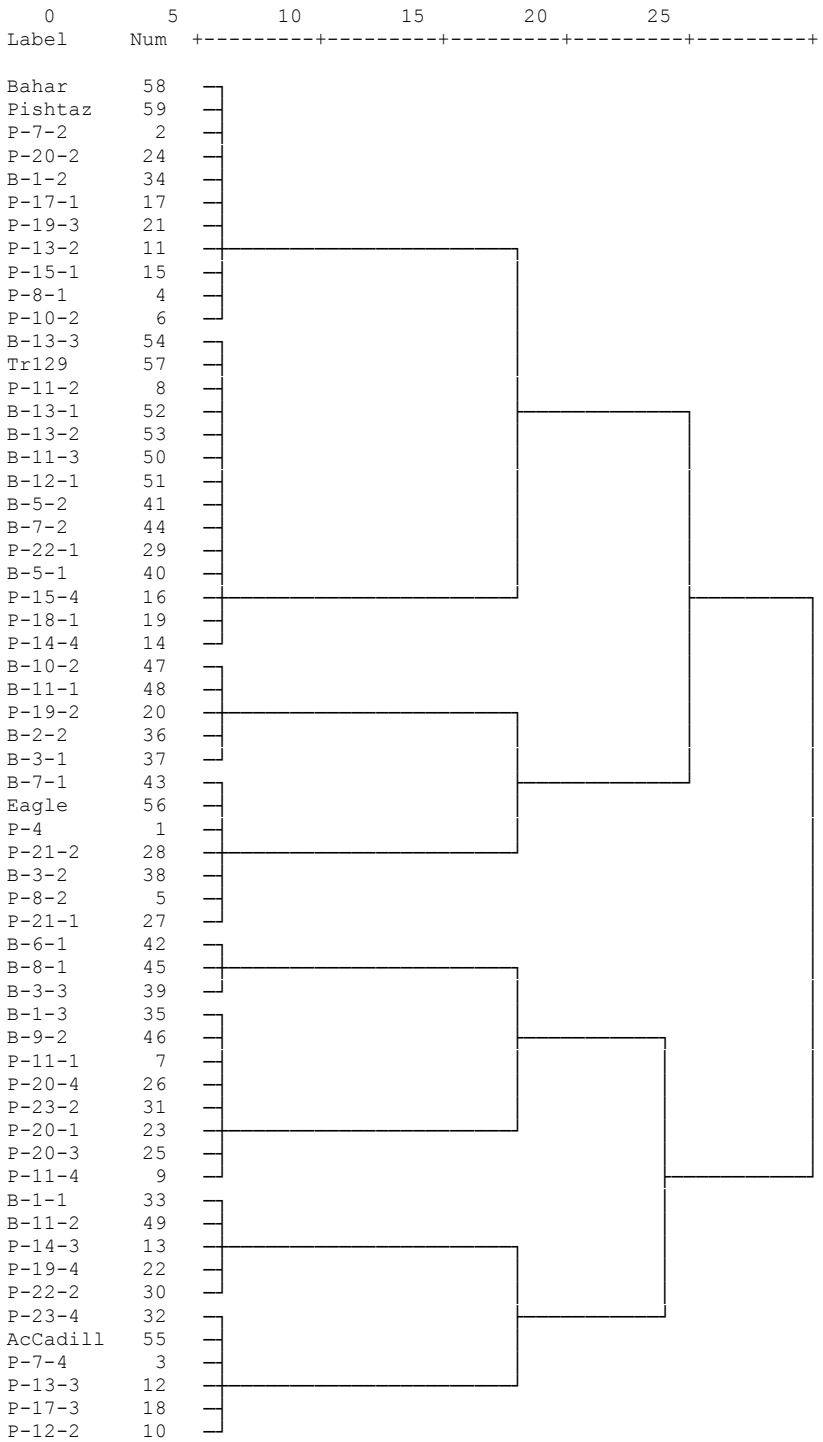
در این تحقیق که به‌منظور انتقال ژن‌های مقاومت به بیماری زنگ سیاه گندم از ارقام Eagle ،AC Cadillac و Tr129 به ارقام زراعی بهار و پیشتاز صورت گرفت، پدیده کوتولگی انبوه علفی در نتاج F_1 حاصل از تلاقی بین ارقام Eagle و بهار مشاهده شد در صورتی که سایر F_1های تولید شده از شرایط نرمال رشد و نمو برخوردار بودند. هیبرید نکروزیس (که برخی مواقع به آن ضعف و یا نقص هیبرید نیز گفته می‌شود) شامل صفات فنوتیپی همچون مرگ سلول، نکروزه شدن بافت، پلاسیده شدن، زرد شدن، کلروزیس، کوتولگی و کاهش سرعت رشد بوده و اغلب موجب مرگ گیاه می‌شود (Bomblies and Weigel., 2007). بذور F_1 تولید شده، در گلخانه با شرایط دمایی ۲۰-۱۸ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی کشت و نگه‌داری شدند. اکثر F_1ها در طی ۶۰ الی ۷۵ روز به سنبله رفته و بذر تولید کردند اما هیبریدهای F_1 حاصل از تلاقی Eagle و بهار با گذشت حدود ۱۲۰ روز بعد کاشت در هر گلدان بین ۱۴ الی ۱۷ پنجه تولید کردند که از این تعداد ۳ الی ۴ سنبله کوچک در هر بوته تولید شد که اکثر گلچه‌های آنها به دلیل عدم رشد و نمو مناسب و تکامل نیافتن سنبلچه‌ها عقیم بودند و در نهایت تعداد ۴۰ عدد بذر از F_1های کشت شده به‌دست آمد. به منظور بررسی اثر تیمار سرما بر روی گل‌دهی، تعدادی از گیاهان F_1 کشت شده به مدت شش هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرارگرفتند و سپس به گلخانه با شرایط فوق‌الذکر منتقل شدند اما هیچگونه تفاوتی بین دو گروه از نظر تولید ساقه گل‌دهنده مشاهده نشد. علاوه بر کاهش شدید ارتفاع، بوته‌های حاصل به شدت علفی بوده و برگ‌های آنها حالت

www.SID.ir

Archive of SID

خشبی و شکننده داشتند (شکل ۶).

با توجه به نظر Canvin و Mcvetty (۱۹۷۶) در گیاهان انبوه علفی اعمال دمای پایین منجر به توقف تقسیم سلولی، سنتز DNA و سنتز فسفولیپیدها می‌شود و خسارت عمده دمائی تشخیص داده نشده است. اعمال طولانی مدت دمای پایین به گیاهان علفی انبوه فقط موجب ایجاد سلول‌های نکروزه وسیع در ناحیه پایین مریستم (اپیکال) خواهد شد.



www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۵. گروه‌بندی نتاج حاصل از تلاقی‌های تکمیلی مرحله دوم بر اساس حضور و یا عدم حضور ژن‌های مقاومت به بیماری زنگ سیاه Sr_{26}، Sr_{42} و $SrTr_{6A}$ با استفاده از تجزیه کلاستر به روش پیوستگی بین گروه‌ها

شکل ۶. مشاهده پدیده کوتولگی انبوه علفی در نتاج حاصل از تلاقی ارقام بهار و Eagle

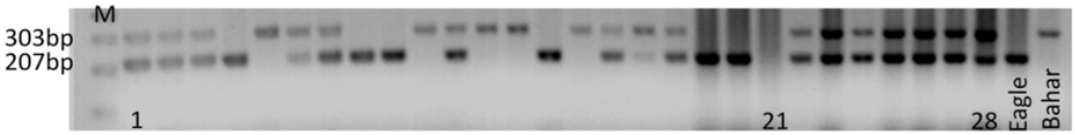
بر خلاف نظرات Hurd (۱۹۶۰) و Mcvetty و همکاران (۱۹۷۶) که هیچ تدبیری نتوانسته است این گیاهان را مجبور به تولید بذر کند و به همین دلیل از هیبریدهای تولید شده نمی‌توان در برنامه‌های به نژادی استفاده کرد و هم چنین مطالعه نحوه توارث قد کوتاهی به طور شایسته امکان پذیر نمی‌باشد، تحقیقات انجام شده نشان داد که با نگه‌داری طولانی مدت در گلخانه با شرایط فوق‌الذکر می‌توان نسبت به تولید بذر از F_1های کوتوله انبوه علفی اقدام کرد و به انجام مطالعات ژنتیکی آنها امیدوار بود. با استناد به آزمایش‌های انجام شده توسط Canvin و Mcvetty (۱۹۷۶)، که رشد نرمال و تولید بذر را تنها به علت نگهداری گیاهان در دمای ۲۶/۵ درجه سانتی‌گراد در تمام طول مدت چرخه زندگی و شدت نور می‌دانستند، آزمایش آنجام شده نشان داد که نگهداری گیاهان در گلخانه با شرایط دمایی۲۰-۱۸ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی با گذشت حدود ۱۲۰ روز پس از کاشت موجب تولید بذر خواهد شد. با توجه به اینکه در سه تلاقی انجام شده با رقم بهار تنها در هیبرید F_1 حاصل از ارقام Eagle و بهار پدیده کوتاه قدی مشاهده شد می‌توان این پدیده را به علت اثر متقابل تکمیل کنندگی ژن‌هایی که از هر دو والد در هیبرید F_1 جمع شده‌اند نسبت داد. بروز صفت کوتولگی انبوه علفی در هیبرید F_1 حاصل از ارقام Eagle و بهار نشان دهنده این واقعیت است که این ارقام می‌توانند حداقل دارای یکی از ژن‌های مؤثر در بروز صفت کوتولگی انبوه علفی باشند، در نتیجه باید در برنامه-های به نژادی که به منظور انتقال ژن‌های مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده از سایر ارقام و یا خویشاوندان وحشی گندم به رقم بهار انجام می‌شود، این مورد را در نظر گرفت. تجزیه ژنتیکی جمعیت-های F_2 و لاین‌های F_3 توسط Hermsen (۱۹۶۷) نشان داد که سه ژن غالب تکمیل‌کننده توارث قد کوتاهی انبوه علفی را در تلاقی‌های بین ژنوتیپ‌های گندم کنترل می‌کنند. این پدیده به علت اثر متقابل تکمیل‌کنندگی ژن‌هایی که از هر دو والد در هیبرید F_1 جمع شده‌اند (دو مکان از سه مکان ژنی) بوجود آمده است (Prasad and Rao, 1960; Worland *et al.*, 1998). مکان ژنی اول با یک آلل غالب، مکان ژنی دوم غالبیت جزئی نشان می‌دهد و مکان ژنی سوم با غالبیت جزئی که اگر دو آلل دیگر هموزایگوت باشند، لازم نخواهد بود (Mcvetty *et al.*, 1976).

به منظور انجام بررسی‌های تکمیلی تعداد ۳۰ عدد از بذور F_1 حاصل از تلاقی ارقام بهار و Eagle مورد کشت قرار گرفتند که از آنها تعداد ۲۸ گیاه F_2 به‌دست آمد. از این تعداد ۱۱ گیاه دارای خصوصیت کوتولگی انبوه علفی و ۱۷ گیاه طبیعی بودند. همچنین از ۲۸ گیاه F_2 به‌دست آمده، تعداد ۲۴ گیاه فاقد ریشک و ۴ گیاه باقی‌مانده که ریشک داشتند از

www.SID.ir

Archive of SID

گیاهان نرمال بودند. پدیده کوتولگی حاصل از دورگ‌ها در تحقیقات انجام شده توسط Aghaee-Sarbarzeh و همکاران (۲۰۰۲) که به منظور انتقال ژن‌های مقاومت به بیماری زنگ از *Ae.ovata* به گندم نان رقم Chinese Spring دارای ژن Ph^I صورت گرفت مشاهده شد. F_1های تولید شده پس از کشت در مزرعه دارای جوانه‌زنی نرمال بودند و تعداد ۳ الی ۴ پنجه نیز از هر هیبرید F_1 تولید شد ولی گیاهان تولید شده همگی قبل ازمرحله گلدهی از بین رفتند. برای تشخیص حضور ژن Sr_{26} در نتاج F_2 حاصل از تلاقی ارقام بهار و Eagle ابتدا از نمونه‌های برگی دی.اِن.اِ استخراج شد و سپس با استفاده از آغازگرهای Sr26#43 و BE518379 واکنش پی.سی.آر صورت گرفت. پس از انجام الکتروفورز و تجزیه و تحلیل ژل‌ها مشخص شد که تعداد ۶ عدد از بوته‌های جمعیت F_2 حامل ژن مورد نظر به صورت هموزیگوت، ۱۶ عدد هتروزیگوت و ۵ عدد از بوته ها فاقد ژن Sr_{26} بودند. در نمونه شماره ۲۱ باند مشاهده نشد (شکل ۷).



شکل ۷. ژل آگارز ۱/۵ درصد برای جایگاه ژنی Sr_{26} با نشانگرهای مولکولی Sr26#43 و BE518379 در نتاج حاصل از تلاقی Bahar/Eagle

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که با انجام تحقیقات کاربردی استفاده از نشانگرهای مولکولی، اطلاعات مورد نیاز در زمینه انتخاب والدین تلاقی‌ها برای انتقال مؤثر ژن‌های مقاومت به زنگ‌های گندم در اختیار به‌نژادگران قرار خواهد گرفت. در این رابطه بهتر است که از تعداد نشانگر بیشتری جهت افزایش احتمال مشاهده پلی مورفیسم بین والدین استفاده شود. در انتقال ژن Sr_{26} با استفاده از تلاقی رقم Eagle با رقم زراعی بهار با پدیده Grass-clump Dwarfismکوتولگی انبوه علفی در نسل F_1 مواجه شدیم که این امر می تواند در هرمی کردن ژن‌ها نقش بازدارنده داشته باشد. درانتقال ژن‌های مقاومت با منشأ گونه‌های خویشاوند وحشی با توجه به امکان انتقال قطعات کروموزومی بیگانه که دارای پیوستگی با برخی از ژن‌های نامطلوب می‌باشند بهتر است که با احتیاط عمل شود و در صورت امکان از منابع مختلف برای انتقال ژن‌های مقاومت استفاده کرد. در رابطه با هرمی کردن ژن‌های مقاومت در برنامه‌های به نژادی، پیشنهاد می‌شود که از بلوک‌های ژنی مقاومت به بیماری که حاوی چند ژن شناخته شده می‌باشند برای انتقال ژن‌های مقاومت در زمینه ژنتیکی ارقام و لاین‌ها استفاده شود. استفاده از چند تلاقی همسو و با اهداف مشترک می‌تواند موجب افزایش احتمال موفقیت در انجام پروژه‌های به نژادی گردد. همچنین لازم است که، نحوه پراکنش نژادهای بیماری موجود در سطح کشور هر ساله با استفاده از خزانه‌های تله مورد بررسی قرار بگیرد و نژادهای جدید بیماری شناسایی شده در سطح منطقه و جهان به صورت مستمر ردیابی شوند.

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES

Aghaee-Sarbarzeh M, Ferrahi M, Singh S, Singh H, Friebe B, Gill BS, Dhaliwal H S (2002) Ph1-induced transfer of leaf and stripe rust-resistance genes from *Aegilops triuncialis* and *Ae. geniculata* to bread wheat. Euphytica. 127: 377-382.

Aung T, Kerber ER (1994) Incorporation of leaf rust resistance from wild tetraploid in to cultivated hexaploid wheat. Ann. Wheat Newslet. 40: 83-84.

Bamdadian A, Torabi M (1978) Epidemiology of wheat stem rust in southernareas of Iran in 1976. Iranian Journal of Plant Pathology. 14: 14-19.

Bomblies K, Weigel D (2007) Hybrid necrosis: autoimmunity as a potential gene-flow barrier in plant species. Nature Reviews Genetics. 8: 382-393

Canvin DT, Mcvetty PBE (1976) Hybrid grass-clump dwarf ness in wheat: Physiology and genetics. Euphytica, 25(1): 471-483.

Fetch T, Zegeye T (2009) Inheritance of resistance to Ug99 in wheat line Tr129 with an introgression of *Aegilops triuncialis* chromatin. Page 33. Proceedings of 12th International Cereal Rusts and Powdery Mildews Conference. 2009 Oct. 13-16. Antalya, Turkey.

Ghazvini H, Hiebert CW, Zegeye T, Fetch T (2012) Inheritance of stem rust resistance derived from *Aegilops triuncialis* in wheat line Tr129. Can. J. Plant Sci. 92(6): 1037-1041.

Ghazvini H, Hiebert CW, Zegeye T, Liu S, Dilawari M, Anderson JA, Rouse MN, Jin Y, Fetch T (2012) Inheritance of resistance to Ug99 stem rust in wheat cultivar Norin 40 and genetic mapping of *Sr42*. Theor. Appl. Genet. 125: 817-824.4.

Hermsen JGT (1967) Hybrid dwarfness in wheat. Euphytica 16: 134-162.

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

Hurd EA (1960) An investigation of dwarf and winter habit in wheat using monosomic and chemical methods. Ph.D. thesis, Univ. of Manitoba, Winnipeg, Man.

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

Knott DR (1989) The Wheat Rust, Breeding for Resistance. Monographs on Theoretical and Applied Genetics 12. Springer-Verlag. Berlin, Heridelberg. pp. 201.

Liu S, Yu L, Singh RP, Jin Y, Sorrells ME, Anderson JA (2009) Diagnostic and co-dominant PCR marker assay for stem rust resistance genes Sr_{25} and Sr_{26}. Theor. Appl. Genet. 120: 691-697.

Lukaszewski AJ (2000) Manipulation of the 1RS.1BL translocation in wheat by induced homoeologous recombination. Crop Sci. 40: 216-225.

McIntosh RA (1988) Catalogue of gene symbols for the wheat. In: Miller TE and Koebner RMD (eds). Proceeding of the 7th International Wheat Genetics Symposium vol.2. Institute Of Plant Science Research: Cambridge, UK. pp: 1225-1323.

Mcvetty PB, David E, Canvin T, Hood CH (1976) Temperature Requirements for Growth of Grass-clump Dwarf Wheat and the Inheritance of the Trait. Euphytica 25(1): 471-483.

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 RP (2009) Detection of wheat stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) race TTKSK (Ug99) in Iran. Plant Disease. 93: 317.

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.

www.SID.ir

Archive of SID

Prasad RB, Rao MV (1960) Inheritance studies in wheat VII. Inheritance of filed reaction of stem rust and certain other characters in crosses of common wheat. Ind. J. Agr. Sci. 30: 169-215.

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.

Riley R, Chapman V (1958) Genetic control of the cytologically diploid behavior of hexaploid wheat. Nature. 182: 713-715.

Roelfs AP (1978) Estimated losses caused by rust in small grain cereal in the United States during 1918- 1976. Miscellaneous publication 1363. (United States Department of Agriculture; Washington DC.)

Roelfs AP (1985) Epidemiology in North America. pp: 403-434 in Roelfs, A. P. and Bushnell, W. R., (eds). The Cereal Rusts Vol.II; Diseases, Distribution, Epidemiology and Control. Academic Press, Orlando.

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

Sears ER (1976) Genetic control of chromosome pairing in wheat. Ann. Rev. Genet. 10: 31-51.

Sears ER, Okamoto M (1958) Intergenomic chromosome relationship in hexaploid wheat. p. 258-259. Proc. 10th Int. Cong. Genet., Montreal, Canada.

Sharif GH, Bamdadian A, Daneshpajoh B (1970) Physiological races of wheat stem rust in Iran (1965-1970). Journal of Applied Entomology and Phytopathology 6: 73-100.

Singh RP, Hodson DP, Huerta-Espino J, Jin Y, Bhavani S, Njau P, Herrera-Foessel S, Singh PK, Singh S, Govindan V (2011) The Emergence of Ug99 Races of the Stem Rust Fungus is a Threat to World Wheat Production. Annu. Rev. Phytopathol. 49: 465–481.

Stakman EC, Stewart DM, Loegering WQ (1962) Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. Agricultural Research Service E617. (United States Department of Agriculture: Washington DC.)

Worland AJ, Korzun V, Rooder MS, Ganal MW, Law CN (1998) Genetic analysis of the dwarfing gene Rht8 in wheat. Part II. The distribution and adaptive significance of allelic variants at the Rht8 locus of wheat as revealed by microsatellite screening. Theor. Appl. Genet. 96: 1110-1120.

www.SID.ir