



ظهور و گسترش نژادهای Ug99 قارچ عامل زنگ سیاه و خلاصه ای از تحقیقات انجام شده برای کنترل موثر این بیماری با استفاده از ژنهای مقاومت به زنگ سیاه در گندم

حبیب اله قزوینی

کرج، جاده ماهدشت، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر (شهرک اصلاح بذر)، بخش تحقیقات غلات، صندوق پستی ۳۱۵۸۵-۴۱۱۹
Cereal Research Centre, Agriculture & Agri-Food Canada, 195 Dafoe Road, Winnipeg, MB, Canada R3T 2M9.

Habib_ghaz@yahoo.com

آدرس پست الکترونیکی:

Habibollah.ghazvini@agr.gc.ca

چکیده

قارچ پوکسینیا گرامینیس زیر گونه تریتیسی (*Puccinia graminis* Pers.:Pers. f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn.) عامل ابتلا به بیماری زنگ سیاه در گندم بوده که این بیماری در صورت اپیدمی در یک منطقه می تواند باعث بروز خسارت سنگینی در تولید گندم شود. با کشف و یکارگیری ژنهای موثر مقاومت به زنگ سیاه در برنامه های اصلاحی گندم و انتقال آنها به واریته های زراعی خسارت ناشی از بیماری در ۴۰ سال گذشته به طور بی سابقه ای در سطح دنیا کاهش یافته و حتی این گونه استنباط می شد که بیماری زنگ سیاه در حال ریشه کن شدن است. در سال ۱۹۹۸ نژاد جدیدی از زنگ سیاه در اوگاندا با قدرت بیماریزایی بر روی ژن *Sr31* مشاهده شد بوده و در سال ۱۹۹۹ این نژاد با نام Ug99 به دنیا معرفی گردید. این نژاد بسرعت در حال تکامل بوده و تا کنون چندین نژاد دیگر مشتق شده از نژاد اولیه Ug99 با قدرتهای بیماریزایی متفاوت از نژاد اولیه شناسایی شده اند. با توجه به قدرت بیماریزایی نژادهای لینه Ug99 بر روی اکثر واریته های گندم موجود این نژادها تهدیدی برای تولید گندم در نقاط مختلف جهان به حساب آمده و در صورت اپیدمی بیماری ناشی از گسترش این نژادها، تولید جهانی محصول گندم می تواند در معرض تهدیدی جدی قرار گیرد. کشف و انتقال ژنهای جدید مقاومت به زنگ سیاه به ارقام زراعی گندم و هرمی نمودن ژنهای مقاومت در ژرم پلاسما سازگار از دیر باز سیاست موفقیتی برای کنترل بیماریزایی ناشی از نژادهای جدید قارچ بوده است و انتظار می رود که در آینده نیز راهکار اصلی مبارزه بر علیه این بیماری خطرناک باشد. در این تحقیق ظهور و گسترش نژادهای Ug99 زنگ سیاه مورد بررسی قرار گرفته و خلاصه ای از بررسی های انجام شده در تعیین مقاومت ژنهای موجود در خزانه ژنتیکی نسبت به نژادهای لینه Ug99 و نیز تلاشهای صورت گرفته در کشف و مکان یابی کروموزومی ژنهای جدید مقاومت به زنگ سیاه ارائه می گردد.

کلمات کلیدی: زنگ سیاه گندم، نژاد های Ug99، نشانگرهای ریزوماهواره، نقشه های کروموزومی، هرمی کردن ژنهای مقاومت

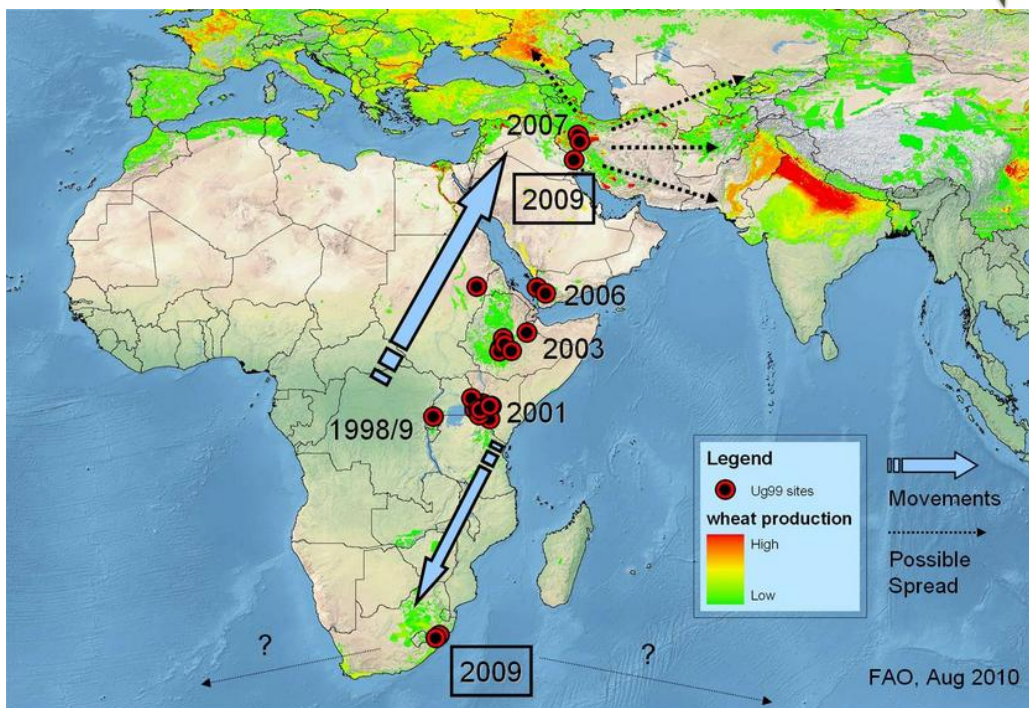
مقدمه

قارچ پوکسینیا گرامینیس زیر گونه تریتیسی (*Puccinia graminis* Pers.:Pers. f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn.) عامل ابتلا به بیماری زنگ سیاه یا زنگ ساقه گندم، بعنوان یکی از مخرب ترین بیماریهای قارچی گندم در اغلب نقاط جهان شناخته می شود. چندین



منطقه غله خیز دنیا از مناطق مساعد برای گسترش بیماری زنگ سیاه بوده و در نتیجه محصول گندم این مناطق همواره در معرض تهدید این بیماری است. بیماری زنگ سیاه بطور 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 (27). 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 (22, 35). در سالهای بعد از این اپیدمی، استفاده از ژنهای موثر مقاوم به زنگ سیاه در برنامه های اصلاحی گندم و انتقال آنها به واریته های زراعی باعث شد خسارت ناشی از بیماری به طور بی سابقه ای کاهش یافته و حتی این گونه استنباط می شد که این بیماری در حال ریشه کن شدن است. مهمترین ژنهایی که باعث دوام مقاومت به زنگ سیاه در سطح جهان شدند عبارت بودند از *Sr24*، *Sr26*، *Sr31*، *Sr36* و *Sr38* که همگی از طریق خویشاوندان وحشی گندم و یا چاودار زراعی به گندم منتقل شده اند و همچنین ژن *Sr2* که از گندم تورجیدوم به گندم معمولی انتقال یافته است (32). بهر حال با وجود استفاده گسترده از این ژنها در ارقام زراعی گندم در سالهای ۱۹۹۳ و ۱۹۹۴ اپیدمی شدیدی در کشور اتیوپی اتفاق افتاد که این اپیدمی ناشی از حساسیت رقم گندم انکوی (*Enkoy*)، رقم رایج گندم در اتیوپی، به زنگ سیاه بود (31). در سال ۱۹۹۸ نژاد جدیدی از زنگ سیاه در اوگاندا مشاهده شد که روی ژن *Sr31* بیماری زا بوده و در سال ۱۹۹۹ این نژاد به دنیا معرفی شده و چون این نژاد برای اولین بار در سال ۱۹۹۹ در اوگاندا مشاهده شده بود آن را *Ug99* نام گذاشتند (24). اهمیت نژاد *Ug99* زنگ سیاه وقتی بیشتر شد که مشخص گردید که این نژاد می تواند تهدیدی برای تولید گندم در نقاط مختلف جهان به حساب آمده و خطر بالقوه ای برای تولید جهانی محصول گندم بشمار آید. نژاد *Ug99* بعد از اوگاندا در سال ۲۰۰۲ میلادی در کنیا و در سال ۲۰۰۳ در اتیوپی گزارش شد و در سال ۲۰۰۷ به شمال سودان و یمن منتقل شد (شکل ۱). گسترش این نژاد به یمن بسیار مهم و تهدید کننده تلقی شد چون نشان می داد که *Ug99* در حال حرکت به سمت مناطق مهم گندم خیز خاور میانه و آسیا می باشد. وقوع *Ug99* (نژاد *TTKSK*) در همین سال برای اولین بار در مناطق شمال غربی ایران و در اطراف بروجرد و همدان گزارش شد (19) (شکل ۱). با توجه به خشکسالی گسترده در ایران در سال ۲۰۰۸ هیچ گزارشی مبنی بر مشاهده بیماری در این سال داده نشد ولی در سال ۲۰۰۹ نژاد *Ug99* در استان خوزستان در جنوب ایران، جایی که گندمهای بهاره کشت می شوند، گزارش شد. در هر حال تا کنون شواهدی دال بر این که نژاد جدید بطور گسترده ای در ایران مستقر شده باشد و باعث خسارت به محصول گندم شده باشد وجود ندارد و بیماری فقط در بعضی از سالها بصورت لکه ای و نادر در مناطق مزبور مشاهده شده است. همچنین تا کنون هیچ گزارشی مبنی بر این که بیماری زنگ سیاه از مناطق غربی ایران فراتر رفته باشد به چشم نمی خورد.

نژاد *Ug99* اولیه با قدرت بیماریزایی بر روی ژن *Sr31* در سال ۲۰۰۶ با استفاده از سیستم کدهی حروفی تعیین نژاد روتلف و مارتینز (26) و با استفاده از چهار گروه لاینهای افتراقی به عنوان نژاد *TTKS* شناخته شد (37). نژادهای جدید پاتورژن 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 کدهی حروفی بین المللی، نژاد اولیه *Ug99* با قدرت بیماریزایی بر روی ژن *Sr31* بعنوان *TTKSK* و نژادهای جدید پاتورژن با قدرت بیماریزایی بر روی ژنهای *Sr24* و *Sr26* بترتیب *TTKST* و *TTKSK* نام گرفتند (10, 11) (جدول ۱). نژاد *Ug99* همچنان به سیر تکاملی خود در قاره آفریقا ادامه می دهد و چهار نژاد جدید مشتق شده از نژاد *Ug99* (*PTKSK*، *TTKSP*، *TTKSF*) و *PTKST* با قدرت بیماریزایی متفاوت از نژادهای قبلی در سالهای ۲۰۰۷ تا ۲۰۰۹ در کنیا، آفریقای جنوبی و اتیوپی شناسایی شده اند (21) (جدول ۱). اخیرا نژاد جدیدی از لینه *Ug99* با کد *TTKSF+* با قدرت بیماریزایی بر روی واریته ماتلاباس که به نژاد *TTKSF* مقاوم می باشد در آفریقای جنوبی و زیمبابوه شناسایی شده است (23).



شکل ۱. نقشه گسترش نژاد Ug99 از اوگاندا به سایر نقاط آفریقا و خاور میانه در طی سالهای ۲۰۱۰-۱۹۹۹ و مناطق احتمالی گسترش این نژاد در سالهای آتی (برگرفته از سایت سازمان خواربار جهانی FAO).

جدول ۱. نژادهای جدید زنگ سیاه مشتق شده از نژاد اولیه Ug99 (TTKSK) تا سال ۲۰۱۰ و توانایی بیماریزایی آنها بر روی ژنهای مختلف مقاومت به زنگ سیاه (برگرفته از مقاله سینگ و همکاران، ۲۰۱۱).

کشور و سال شناسایی نژاد	بیماریزایی بر روی ژنهای مختلف مقاومت				نام مصطلح	نژاد
	Sr36	Sr24	Sr21	Sr31		
Uganda (1998), Kenya (2001), Ethiopia (2003), Sudan (2006), Yemen (2006), Iran (2007)	غیر بیماریزا	غیر بیماریزا	بیماریزا	بیماریزا	Ug99	TTKSK
South Africa (2000), Zimbabwe (2009)	غیر بیماریزا	غیر بیماریزا	بیماریزا	بیماریزا		TTKSF
Kenya (2006)	غیر بیماریزا	بیماریزا	بیماریزا	بیماریزا	Ug99+Sr24	TTKST
Kenya (2007)	بیماریزا	غیر بیماریزا	بیماریزا	بیماریزا	Ug99+Sr36	TTTSK
South Africa (2007)	غیر بیماریزا	بیماریزا	بیماریزا	بیماریزا		TTKSP
Kenya (2007), Ethiopia (2007)	غیر بیماریزا	غیر بیماریزا	غیر بیماریزا	بیماریزا		PTKSK
Kenya (2008), South Africa (2009)	غیر بیماریزا	بیماریزا	غیر بیماریزا	بیماریزا		PTKST

اگر چه کنترل شیمیایی بیماری می تواند بطور موثری از خسارت پاتوژن به محصول گندم بکاهد و سموم موثری نیز برای کنترل بیماری زنگ سیاه در دسترس می باشند، بهترین راه مبارزه بر علیه بیماری استفاده از ژنهای مقاومت به بیماری در اقام گندم است. 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 موجود بود (9, 17). از زمان کشف نژاد جدید Ug99 و سایر نژادهای مشتق شده از آن که با قدرت بیماریزایی بالا تولید گندم در جهان را تهدید می کنند تحقیقات گسترده ای 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 شده است (7, 9, 16, 38). حاصل این تحقیقات تا کنون نامگذاری حدود ۱۲ ژن جدید (*Sr46* تا *Sr57*) و نیز کشف و شناسایی چندین ژن غیر کاتالوگ شده دیگر که احتمالاً این ژنها نیز منابع جدیدی از مقاومت هستند می باشد (جدول ۲). ژنهای مزبور اکثراً دارای مقاومت نسبت به یک و یا چند واریانت نژاد Ug99 می باشند و منابع بسیار مفیدی برای اصلاح گندمهای مقاوم به زنگ سیاه خصوصاً لینه Ug99 در آینده خواهند بود. اگرچه تعداد قابل توجهی از ژنهای مقاوم به نژاد Ug99 مقاومت بالا تا متوسطی را به نژادهای لینه Ug99 نشان می دهند، در بین آنها تنها ژنهای *Sr22*، *Sr26*، *Sr35* و *Sr50* در برابر کلیه نژادهای موجود مقاومت موثری دارند (31). بهر حال، با توجه به اینکه منشأ کلیه ژنهای مذکور از خویشاوندان وحشی و یا ژنهای غیرخویشاوند گندم است جهت استفاده موثر از این ژنها نیاز به کوچک نمودن اندازه قطعه دی ان آ انتقالی از خویشاوندان وحشی به گندم زراعی در حد ممکن بوده تا عوارض ناشی از بروز ژنهای نامطلوب ناشی از پدیده کشش لینکاژی در حد ممکن کاهش یابد.

پس از شیوع اپیدمی زنگ سیاه در اوگاندا تحقیقات گسترده ای بر روی ژنهای موجود در خزانه ژنی مقاومت به این بیماری جهت بررسی واکنش این ژنها نسبت به نژاد جدید و همچنین شناسایی منابع جدید مقاومت و پیدا کردن مارکرهای مولکولی برای ژنهای موثر نسبت به نژاد Ug99 آغاز شد. در این مقاله، خلاصه ای از تحقیقات انجام شده برای کشف و یا ترسیم نقشه ژنتیکی ژنهای جدید مقاومت به زنگ سیاه با تاکید بر مقاومت به نژاد Ug99، و تکنیکها و متدهای ژنتیکی جدید بکار گرفته شده در کشف و یا ترسیم نقشه ژنتیکی این منابع جدید مقاومت در مرکز تحقیقات غلات کشور کانادا (Cereal Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Winnipeg, Canada) که توسط نگارنده انجام شده شرح داده خواهد شد. بطور کلی در این مقاله نحوه شناسایی و رسم نقشه ژنتیکی چهار ژن مقاومت به زنگ سیاه (*Sr42*، *Sr54*، *SrTr6A*، *SrTr2B*) در لاینهای گندم نورین ۴۰ و *Tr129* مورد بررسی قرار گرفته و در آخر امکان استفاده از این ژنها در برنامه های اصلاحی گندم در کشور بحث خواهد شد.

در طی بررسیهایی مقدماتی که برای شناسایی ارقام و لاینهای مقاوم به نژاد Ug99 انجام شد مشخص گردید که ژن مقاومت *Sr42* که قبلاً در رقم گندم نورین ۴۰ شناسایی شده بود (17) مقاومت خوبی نسبت به نژاد TTKSK لینه Ug99 دارد (24). به همین دلیل تلاش برای شناسایی دقیق محل این ژن برای استفاده در گزینش با استفاده از نشانگرها (Marker assisted selection, MAS) آغاز شد. در روند تحقیقات انجام شده برای ترسیم نقشه کروموزومی ژن *Sr42* در رقم نورین ۴۰، دومین ژن مقاومت به زنگ سیاه در این رقم که تاکنون نا شناخته باقی مانده بود کشف و نقشه کروموزومی آن رسم گردید. لاین گندم *Tr129* از دیگر لاینهایی بود که تحت آزمایشات جدول ۲. لیست ژنهای مقاومت به زنگ سیاه موجود در خزانه ژنی گندم، مکان کروموزومی ژن، ژنهای پیوسته، منبع اولیه و لاین تستر ژن مقاومت، و واکنش ژن نسبت به لینه Ug99 زنگ سیاه

کد	مکان	سایر ژنها	مقاومت	منبع		
ژن	ژن	پیوسته	به	منبع		
Sr	ژن	منبع اولیه کشف ژن	لاین تستر	Ug99		
2	3BS	Lr27, pbc	T. turgidum (Yaroslav emmer)	CnS(Hope3 B)	+	Knott, DR 1968. Can. J. Genet. Cytol. 10:311-320
5	6DS		T. aestivum (Reliance)	ISr5-Ra	-	Sears, ER et al. 1957. J. Am. Soc. Agron. 49:208-212
6	2DS	Lr2, Lr15	T. aestivum (Red Egyptian)	ISr6Ra	-	Knott, DR and Anderson, RG 1957. Can. J. Agric. Sci. 36:174-195



7a	4BL		T. aestivum (Kenya117A)	Line G sel	-	Knott, DR 1957. Can. J. Plant Sci.37:366-384
7b	4BL		T. aestivum (Marquis)	ISr7b-Ra	-	Loeering, WQ and Sears, ER 1966. Crop Sci. 6:157-160
8a	6AS		T. aestivum (Red Egyptian)	ISr8-Ra	-	Knott, DR and Anderson, RG 1956. Can. J. Agric. Sci. 36:174-195
8b	6AS		T. aestivum (Barleta Benvenuto)	Barleta Benvenuto	-	Singh, RP and McIntosh, RA 1986. Can. J. Genet. Cytol. 28:189-197
9a	2BL	Lr13,2 3; Yr5,7	T.aestivum (Red Egyptian)	ISr9a-Ra	-	Knott, DR 1966. Hereditas (suppl) 2:156-166
9b	2BL	Lr13,2 3; Yr5,7	T. aestivum (Kenya117A)	W2691Sr9b	-	Green, GJ et al. 1960. Can. J. Pl. Sci. 40:524-538
9d	2BL	Lr13,2 3; Yr5,7	T. turgidum (Yaroslav emmer)	ISr9d Ra	-	Loeering, WQ 1970. Z. Pflanzenzuchtung 64:335-339
9e	2BL	Lr13,2 3; Yr5,7	T. turgidum (Vernal emmer)	Vernstein	-	McIntosh, RA and Luig, NH 1973. Proc. Int. Wheat Genet. Symp., pp. 425-432
9f	2BL	Lr13,2 3; Yr5,7	T. aestivum (Chinese Spring)	Chinese Spring	-	Loeering, WQ 1975. Phytopathology 65:925
9g	2BL	Lr13,2 3; Yr5,7	T. aestivum (Lee)	CnSSr9g	-	McIntosh, RA 1981. Z. Pflanzenzuchtung 87:274-289
10	2B		T. aestivum (Egypt NA95)	W2691Sr10	-	Knott, DR and Anderson, RG 1956. Can. J. Agric. Sci. 36:174-195
11	6BL		T. aestivum (Lee)	ISr11-Ra	-	Green, GJ et al. 1960. Can. J. Pl. Sci. 40:524-538
12	3BS		T. turgidum (Iumillo durum)	BtSr12Tc	-	Sheen , SJ and Snyder, LA 1964. Can. J. Genet. Cytol. 6:74-82
13	6AL	Srdp2	T. turgidum (Kaphli emmer)	W2691Sr13	+	Knott, DR 1962. Can. J. Pl. Sci. 42:415-419
14	1BL		T. turgidum (Kaphli emmer)	Line A sel	+	Knott, DR 1962. Can. J. Pl. Sci. 42:415-419
15	7AL	Lr20. Pm1	T. aestivum (Norka)	W2691Sr15	-	Watson, IA and Luig, NH 1966. Euphytica 15:239-250
16	2BL	SrKt2	T. aestivum (Thatcher)	ISr16-Ra	-	Loeering, WQ and Sears, ER 1966. Crop Sci. 6:157-160
17	7BL	Lr14a, Pm5	T. turgidum (Yaroslav emmer)	CS (Hope7B)	-	McIntosh, RA, Luig, NH, Baker, EP 1967. Aust. J. Biol. Sci. 20:1181-1192
18	1D		T. aestivum (Marquis)	LCSr18Mq	-	Baker, EP et al. 1970. Aust. J. Biol. Sci. 23:369-375
19	2BS		T. aestivum (Marquis)	LCSr19Mq	-	Anderson, MK et al. 1971. Crop Sci. 11:556-558
20	2BL		T. aestivum (Marquis)	LC	-	Anderson, MK et al. 1971. Crop Sci. 11:556-558
21	2AL		T. monococcum	Einkorn	-	The, TT 1973. Nature New Biology 241:256
22	7AL		T. monococcum	SwSr22T.B	+	The, TT 1973. Nature New Biology 241:256
23	2BS	Lr16	T. aestivum (Exchange)	Exchange	-	McIntosh, RA and Luig, NH 1973. Aust. J. Biol. Sci. 26:1145-1152
24	3DL	Lr24	Thinopyron ponticum	BtSr24Agt	+	McIntosh, RA et al. 1977. Aust. J. Biol. Sci. 28:37-45
25	7DL	Lr19	Thinopyron ponticum	LCSr25Ars	+	McIntosh, RA et al. 1977. Aust. J. Biol. Sci.



26	6AL		Thinopyron ponticum	Eagle (Australian)	+	28:37-45 Knott, DR 1961. Can. J. Plant Sci. 41:109-123
27	3A	SrSatu	Secalis cereale (Imperial rye)	W2691Sr27	+	Acosta, AC 1962. Diss. Abstr. 23:34-35
28	2BL		T. aestivum (Kota)	W2691Sr28 Kt	+	McIntosh, RA 1978. Heredity 41:71-82
29	6DL		T. aestivum (Etiolle de Choisy)	PusaSr29Ed ch	-	Dyck, PL and Kerber, ER 1977. Can. J. Genet. Cytol. 19:371-373
30	5DL		T. aestivum (Webster)	BtSr30Wst	-	Knott, DR and McIntosh, RA 1978. Crop. Sci. 17:365-369
31	1BL	Lr26, Yr9	Secalis cereale (Imperial rye)	Line ESr31Kvz	-	Singh, NK, Shepherd, KW, McIntosh, RA 1990. Theor. Appl. Genet. 80:609-616
32	2A, 2B		T. speltoides	ER5155	+	McIntosh, RA, et. al 1995. Proc 8th Int Wheat Genet Symp, pp 1333-1500
33	1DL	Lr21	T. tauschii	TetraCanth atch	+	Kerber, ER 1979. Proc. Int. Wheat Genet. Symp., 5th, New Delhi, pp. 358-364
34	2A,2B	Yr8	T. comosa	Compair	-	McIntosh, RA 1983. Can. J. Pl. Path. 5:61-69
35	3AL		T. monococcum	Mq(2)5xG2 919	+	McIntosh, RA 1984. Z. Pflanzenzuchtung 92:1- 14
36	2BS		T. timopheevi	W2691SrTt -1	+	McIntosh, RA 1971. Z. Pflanzenzuchtung 66:240-248
37	4BL		T. timopheevi	W2691SrTt -2	+	McIntosh, RA 1971. Z. Pflanzenzuchtung 66:240-248
38	2AS	Lr37,Y r17	T. ventricosa	VPM1	-	Bariana, HS and McIntosh, RA 1994. Euphytica 76:53-61
39	2B	Lr35	T. speltoides	RL5711	+	Kerber, ER and Dyck, PL 1990 Genome 33:530- 537
40	2BS		T. araraticum	RL6087	+	Dyck, PL 1992. Genome 35:788-792
41	4D		T. aestivum (Waldron)	WDR-B1	-	Riede, CR, et. al. 1994. Theor. Appl. Genet. 90:1158-1163
42	6DS	Sr5	T. aestivum (Norin 40)	Norin 40	+	Kim, N-S 1993. Theor. Appl. Genet. 85:561- 567
43	7D		Thinopyron ponticum	KS10-2	+	Kibirige-Sebunya, I and Knott, DR 1983. Can. J. Genet. Cytol. 25:215-221
44	7DS		Thinopyron intermedium	TAF2, W3592	+	Friebe, B et al. 1996. Euphytica 91:59-87
45	1DS		T. tauschii	RL5289	+	Marais, GF Personal Communication
46	2DS		T. tauschii	AUS 18913	+	Rouse, MN, et al. 2011 Crop Sci. 51:2074-2078; Olson, EL 2012 Ph.D. thesis Kansas State University
47	2BL		Ae. speltoides	DAS15	+	Klindworth, DL, et al. 2012 Genes, Genomes, Genetics. 2:665-673.
48	2AL		T. aestivum (Arina)	Arina	+	Bansal, UK, et al. 2009 Plant Pathology 58:1039- 1043
49	5BL		T. aestivum	AUS 28011	-	McIntosh, RA 2010 Annual Wheat Newsletter 56:277
50	1DS		Secalis cereale (Imperial rye)	T6-1	+	Anugrahwati, DR et al. 2008 Genome 51: 341- 349
51	3AS, 3BS, 3DS 6A		Ae. searsii	T3DS- 3S ^S .3S ^S L	+	Liu, W et al. 2011 Theor Appl Genet 122:1537- 1545
52	L 5D		Dasypyrum villosum	-	+	Qi, LL, et al. 2011 Theor Appl Genet 123:159- 167
53	L		Aegilops geniculata	TA5599	+	Liu, W et al. 2011 Chromosome Res 19:669- 682
54	2D		T. aestivum (Norin 40)	Norin 40	-	Ghzvini, H et al. 2012 Theor Appl Genet



55	L 7D S	40)	-	-	+	(Submitted) Krattinger, S.G et al. 2009 Science 323:1360-1363; Olson, EL 2012 Ph.D. thesis Kansas State University http://globalrust.org/db/attachments/blog/231/10/Objective-25.pdf
56	5B L 7D	-	-	-	?	http://globalrust.org/db/attachments/blog/231/10/Objective-25.pdf
57	S	-	-	-	?	http://globalrust.org/db/attachments/blog/231/10/Objective-25.pdf

دنباله جدول ۲. لیست ژنهای بدون کد

کد ژن Sr	مکان ژن	سایر ژنها پیوسته	منبع اولیه کشف ژن	لاین تستر	مقاومت به Ug99	منبع
; Agi			T. Aestivum (Frn//Ky58/Nth)	8N122	-	Unpublished
dp-2			Ae. intermedium	A. intermedium deriv.	-	Unpublished
Em			T. turgidum (Golden Ball)	Media Ap9d	-	Unpublished
Gt			T. aes (Entrelargo deMontijo)		-	McIntosh, RA 1995. Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes
H			T. aestivum (Gamut)	BtSrGtGt	-	Unpublished
Kt-2	2B L		T. aestivum (H-44)	H44 deriv.	-	Unpublished
LC			T. aestivum (Kota)	Line AE sel	-	Unpublished
M			T. aestivum (Little Club)	Little Club	-	Unpublished
McN			T. turgidum (Maruccos 623)	Maruccos 623	-	Unpublished
MqX			T. aestivum (McNair 701)	McNair 701	-	Unpublished
Pl			T. aestivum (Marquis)	PdSrXMq	-	Unpublished
Pt			T. turgidum (Peliss)	Peliss	-	Unpublished
A	1D		T. turgid.(Petterson ML68-14)	Petterson ML68-14	-	Unpublished
X	1D		T. taushii	RL5778	-	Innes, R. L., Kerber, E. R. 1994. Genome 37:813
Sat			T. taushii		-	McIntosh, RA PC (AWN40:61)
u			Triticale sp.	Satu triticales	-	McIntosh, RA 1995. Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes
Tm	4B		Triumph 64	Triumph 64	+	Unpublished
p						
Tt-3			T. timopheevi	Fed *2/SrTt-3	+	
U	2D		T. aestivum (Red Egyptian)	CnSSrURE	-	Unpublished
Wl			T. aestivum (Waldron)	BtSrWldWld	-	Unpublished
d1						
Ws			T. aestivum (Webster)	LCSrWst2Wst	-	Unpublished
t-2						
Zda	1B		T. aestivum (Zdar)	Zdar	-	Bartos, P and Kosner, J 1995. Cereal Rusts Powd. Mildew. Bull. 23:1-4
r						



A	2D	T. aestivum (Coteau)	Coteau	-	Williams, ND PC
B	2B	T. aestivum (Coteau)	Coteau	-	Williams, ND PC
	L				
C	2B	T. aestivum (Len)	Len	-	Williams, ND PC
Ca		T. aestivum (AC		+	Hiebert, CW., et al. 2011 Theor. Appl. Genet. 122:143-149
d		Cadillac)	AC Cadillac		
We		T. aestivum	LCSrWst2Wst	+	Hiebert, CW., et al. 2010. Theor. Appl. Genet. 121:65-69
b		(Webster)			
Tr6	6A		Tr129	+	Ghazvini, H., et al. 2012 Can. J. Plant Sci. Published on the web 7 May 2012,10.4141/cjps2011-248
A	S	Aegilops triuncialis			
Tr2	2B		Tr129	-	Ghazvini, H., et al. 2012 Can. J. Plant Sci. Published on the web 7 May 2012,10.4141/cjps2011-248
B	L	Aegilops triuncialis?			

مرزعه ای در ایستگاه تحقیقاتی نجورو کشور کنیا (Njoro, Kenya) مقاومت بسیار خوبی به نژادهای لینه Ug99 نشان داده بود. آزمایشات گلخانه ای نیز مقاومت این لاین نسبت به نژاد TTKSK در مرحله گیاهچه ای را نشان داد. تحقیقات قبلی با استفاده از لاینهای مونوسومی نشان داده بود که ژن مقاومت *Sr42* در روی کروموزوم 6AS در رقم گندم نورین قرارداد (17) و لذا انتظار می رفت تا با استفاده از مارکرهای مولکولی شناخته شده برای بازوی کوتاه کروموزوم 6A بتوان نقشه دقیق این ژن را در رقم نورین ۴۰ ترسیم کرد ولی محل کروموزومی سایر ژنهای ذکر شده در بالا در ژنوم نورین ۴۰ و لاین Tr129 نامشخص بود و قبل از رسم نقشه لینکاژی آنها نیاز بود تا کروموزوم محل استقرار آنها در هر یک از این لاینها تعیین شود.

شناسایی کروموزومهای محل استقرار اکثر ژنهای مقاومت به زنگ سیاه در خزانه ژنی که قبلا کشف شده اند با استفاده از تحقیقات سیتولوژیکی و لاین های مونوسومی انجام شده است (17) و تحقیقات جدید صرفا تلاش دارند تا محل دقیق ژنها در مقایسه با نشانگرهای مولکولی اطراف ژن مشخص شده تا بتوان در گزینش با استفاده از نشانگرها این ژنها را بطور سریع و دقیق به نتاج منتقل نمود. ولی در مورد منابع جدید مقاومت که اخیرا شناسایی شده اند در مرحله اول نیاز به پیدا نمودن مکان ژن مربوطه در روی یک کروموزوم مشخص است.

مشکل اساسی در تجزیه ژنتیکی صفات کیفی در گندم پیدا نمودن محل ژنها در روی کروموزوم خاص است. وقتی که محل کروموزومی ژن مشخص شد نقشه ژنتیکی ژنها به آسانی و از طریق کمک گرفتن از نشانگرهای مولکولی قابل رسم است. چندین روش مختلف سیتولوژیکی شامل تجزیه منوسومیک (28, 30)، تجزیه تلوسنتریکی (29) و مکان یابی ژنتیکی با استفاده از کمبودهای هاپلوئیدی (8) برای شناسایی محل ژنها استفاده شده اند. همچنین از روشهای ژنتیکی نظیر ارزیابی کل ژنوم^۱ (WGM) و تجزیه تفرقی بالکها^۲ (BSA) (18) برای تشخیص محل ژنها استفاده می شود که اولی دارای دقت بسیار بالا ولی بسیار وقت گیر و پر هزینه بوده و دومی روشی سریع ولی با دقت کم بوده ولی تنها قادر به شناسایی ژنهایی است که فاصله نزدیکی با نشانگرهای مولکولی دارند. روش ژنتیکی لاین های تقریبا ایزوژن^۳ (NILs) هم روش بادقتی برای شناسایی محل ژنها می باشد ولی تهیه لاینها وقتگیر بوده و نشانگرهای بکار رفته باید پوشش کروموزومی خوبی برای کل ژنوم داشته باشند تا قادر به شناسایی قطعه ای از ژنوم (و ژن موجود) که در لاینهای مختلف متفاوت است باشند.

در مجموع هر یک از روشهای بکار گرفته شده معایب و محاسن خود را داشته و پیدا نمودن روشی که بتواند با صرف وقت و هزینه های کمتر نسبت به WGM و NILs و دقتی بیشتر از آنچه در روش BSA دیده می شود قادر به شناسایی محل کروموزومی ژنهای صفات کیفی باشد برای محققین علم ژنتیک بسیار مطلوب خواهد بود. در این تحقیق با استفاده از یک روش تغییر یافته تجزیه تفرقی بالکها که تجزیه تفرقی بالکهای چندگانه^۴ (MBSA) نام گرفته و تا حدود زیادی سریع تر و کم هزینه تر از تجزیه کل ژنوم و دارای دقت بالاتری



نسبت به BSA است محل کروموزومی سه ژن جدید مقاومت به زنگ سیاه گندم کشف و نقشه ژنتیکی ژنهای مزبور ترسیم شد. در این مقاله علاوه بر ارائه نقشه های ژنتیکی ژنهای مورد اشاره و ژن *Sr42*، سودمندی روش MBSA در مقایسه با سایر روشهای شناسایی مکانهای کروموزومی ژنها نیز مورد بررسی قرار می گیرد.

۳. Near-isogenic lines

۲. Bulk segregant analysis

۱. Whole genome mapping

۴. Multiple bulk segregant analysis

مواد و روش ها

۱. جمعیت ژنتیکی Norin 40/LMPG-6

جمعیت ژنتیکی مورد استفاده در این مطالعه یک جمعیت دابل هاپلوئید حاصل از گیاهان F_1 و منتج از تلاقی Norin 40/LMPG-6 بود. والد مادری Norin 40 بعنوان والد مقاوم و والد پدری LMPG-6 بعنوان والد حساس در این تلاقی استفاده شدند. با توجه به اینکه رقم Norin 40 یک رقم زمستانه و لاین LMPG-6 یک لاین بهاره هستند تعداد ۲۶۷ لاین دابل هاپلوئید که تیپ بهاره داشتند جهت مطالعات ژنتیکی انتخاب شدند. با توجه به قرنطینه بودن نژاد Ug99 در کشور کانادا و نیاز به امکانات و گلخانه های ویژه کنترل شده جهت مایه کوبی^۱ با اسپورهای این نژاد تصمیم گرفته شد که والدین جمعیت با نژادهای موجود محلی مایه کوبی شوند و صورتی که والدین به نژادهای محلی قارچ واکنش افتراقی^۲ نشان دادند جهت تهیه نقشه ژنتیکی جمعیت یکی از نژادهایی که بهترین واکنش افتراقی را در والدین ایجاد میکند جهت مایه کوبی کل جمعیت ژنتیکی بکار رود. در میان ۸ نژاد محلی بکار رفته نژاد LCBB بیشترین واکنش افتراقی را در والدین موجب گردید (3) و لذا جمعیت دابل هاپلوئید در مرحله یک برگی بر اساس متد بکار رفته توسط فچ (1) با اسپورهای این نژاد تلقیح گردید. دو هفته پس از مایه کوبی جمعیت، رتبه بندی گسترش بیماری در روی برگ اول گیاهچه بر اساس متد استاکمن و همکاران (36) انجام شد. جمعیت دارای یک تفرق ۱:۱ از نظر مقاومت نسبت به نژاد LCBB بود که نشاندهنده وجود یک ژن غالب برای القای مقاومت در لاین نورین ۴۰ بود. دی ان آ ژنومی گیاهان مورد بررسی بر اساس روش پالوتا و همکاران (20) و از برگهای سالم و غیر آلوده استخراج شد. از مارکرهای مولکولی ریزماهواره^۳ که قبلا در ترسیم نقشه لینکاژی کروموزوم 6D گندم بکار رفته (25, 33, 34) جهت رسم نقشه ژنتیکی ژن *Sr42* استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز^۴، چرخه های حرارتی بکار رفته در PCR و تجزیه باندهای دی ان آ با دستگاه تجزیه ژنتیکی ای بی آی ۳۱۰۰^۵ مطابق روشهای بکار برده شده توسط سومرز و همکاران (33) و سوردیل و همکاران (34) بود. نقشه های ژنتیکی با استفاده از برنامه جوینمپ^۶ ترسیم و فاصله های ژنتیکی بر اساس تابع کوسامبی^۷ (12) محاسبه گردیدند. نتایج اولیه نشان داد که کلیه مارکرهای ریزماهواره موجود در روی کروموزوم 6D پیوسته بوده و در فواصل تقریبی از یکدیگر مطابق فواصلی که در تحقیقات قبلی مشخص شده قرار داشتند ولی ژن مقاومت به نژاد LCBB زنگ سیاه هیچ گونه پیوستگی با مارکرهای موجود در روی کروموزوم 6D نشان نداد.

تحقیقات تکمیلی و مایه کوبی ۲۴۸ لاین دابل هاپلوئید از جمعیت مورد مطالعه با نژاد TTKSK (Ug99) نشان داد که ژن مقاومت به نژاد TTKSK یا ژن *Sr42* متفاوت از ژن مقاومت به نژاد LCBB که یک ژن جدید است می باشد و لذا تلاش برای ترسیم نقشه ژنی *Sr42* و همچنین مکان یابی و ترسیم نقشه ژنی ژن جدید بطور همزمان آغاز شد.



الف. ترسیم نقشه ژنی *Str42*: پس از مایه کوبی جمعیت با نژاد TTKSK و اطمینان از تفرق متفاوت جمعیت با این نژاد نسبت به تفرق با نژاد LCBB، پیوستگی ژن *Str42* با مارکرهای ریزماهواره موجود در روی کروموزوم 6D گندم مطابق متدهای شرح داده شده در سطور قبلی و با استفاده از برنامه جوینمپ و بر اساس تابع کوسامبی تحقیق شد.

۱. Inoculation ۲. Differential response ۳. Microsatellite markers ۴. Polymerase chain reaction ۵. ABI 3100 ۶. JOINMAP ۷. Kosambi

ب. ترسیم نقشه ژنی ژن جدید: برای تعیین مکان کروموزومی ژن جدید از یک روش تغییر یافته تجزیه تفرقی بالک با نام تجزیه تفرقی بالکهای چندگانه استفاده شد تا محل ژن مزبور بر روی کروموزوم خاص تعیین شود. مراحل مختلف این روش بطور خلاصه شامل قسمتهای زیر بود:

۱. انتخاب تعداد ۴۲۳ نشانگر مولکولی ریز ماهواره که پوشش خوبی برای تمامی نواحی کروموزومی ۲۱ کروموزوم گندم داشتند (بطور تقریبی یک نشانگر برای هر ۵ سانتی مورگان).

۲. اضافه کردن پرایمرهای نشانگرهای مزبور به میزان لازم برای یک واکنش زنجیره ای پلیمرز در هر چاهک^۱ (۲، ۰ پیکومول از پرایمر مستقیم و ۲ پیکومول از پرایمر معکوس) و در مجموع ۱۶ چاهک در یک صفحه PCR^۲ ۳۸۴ چاهکی (۱۶ ردیف × ۲۴ ستون) بطوری که در چاهکهای هر ستون یک پرایمر و در مجموع ۲۴ پرایمر در هر صفحه PCR قرار داشته باشند.

۳. قرار دادن صفحه های PCR حاوی پرایمرهای نشانگر (مجموعاً ۱۸ صفحه PCR) در یک دستگاه خشک کننده برودتی^۳ (یا در زیر هود) به منظور تبخیر آب موجود و باقی ماندن پرایمر در ته هر چاهک. (تهیه تعداد زیادی از هر یک از این مجموعه های غربالگری ژنتیکی در یک زمان واحد موجب تسهیل در استفاده آنها در زمان دلخواه و برای پروژه های مختلف خواهد بود).

۵. استفاده از صفحه های PCR حاوی پرایمرهای نشانگر برای غربال سریع بالکهای دی ان آ لاینهای مقاوم بطوری که هر بالک دربرگیرنده دی ان آ چهار لاین مقاوم بوده و در مجموع دی ان آ ۵۶ لاین مقاوم در قالب ۱۴ بالک (۱۴ چاهک) با دی ان آ لاینهای والدینی (دو چاهک) مورد مقایسه قرار گرفتند. برای سهولت در انجام PCR در مجموع ۱۶ مخلوط PCR برای هر مینی بالک و یا والدین تهیه شد که هر کدام شامل ۷۵ نانو گرم دی ان آ (۱۸،۷۵ نانوگرم برای هر لاین مقاوم در مینی بالکهای مقاوم)، بافر PCR با غلظت 1x، ۰،۸ میلی مول dNTPs، ۱،۵ میلی مول MgCl₂، ۱،۹ پیکومول پرایمر M13 و یک واحد آنزیم تک پلیمرز^۴ بود.

۶. در مرحله بعد تجزیه باندهای دی ان آ با دستگاه تجزیه ژنتیکی ای بی آی ۳۱۰۰ انجام شد و مقایسه شباهتهای آلی بین بالکهای مقاوم با والد مقاوم و عدم تشابهات آلی بالکهای مقاوم با والد حساس در هر یک از نشانگرهای مولکولی انجام و از نشانگرهایی که تشابهات آلی خوبی بین بالکها و والد مقاوم نشان دادند (نشانگرهای امیدبخش) برای غربال نمودن دی ان آ جمعیت دابل هاپلوئید با فنوتیپ مشخص استفاده شد.

۷. پس از تعیین محل ژن در روی کروموزوم مشخص توسط نشانگرهای مولکولی امیدبخشی که پیوستگی معنی داری با ژن مقاومت داشتند از نشانگرهای ریز ماهواره بیشتری که قبلاً نقشه ژنتیکی آنها در روی آن کروموزوم خاص ترسیم شده استفاده شد تا مکان دقیق ژن در رابطه با نشانگرهای اطراف آن مشخص شود. واکنش زنجیره ای پلیمرز، چرخه های حرارتی بکار رفته در PCR، تجزیه باندهای دی ان آ و رسم نقشه های ژنتیکی مطابق روشهایی که در بالا توضیح داده شد انجام گردید.



۲. جمعیت ژنتیکی RL6071/Tr129

لاین Tr129 از تلاقی گندم رقم مارکوئیز (Marquis) با آزیلوپس گونه تریانسالیس (*Aegilops triuncialis*) و هشت تلاقی برگشتی با رقم مارکوئیز بدست آمده است (4). لاین Tr129 تحت آزمایشات مزرعه ای در کنیا

۱. Well ۲. PCR plate ۳. Freeze dryer or Lyophilizer ۴. Taq polymerase enzyme

مقاومت بسیار خوبی به نژادهای لینه Ug99 نشان داد. مطالعات اولیه بر روی این لاین نشان داد که احتمالا قطعه و یا قطعاتی از دی ان آ که از کروموزوم آزیلوپس به گندم مارکوئیز منتقل شده است باعث مقاومت به نژادهای Ug99 می شود چون رقم مارکوئیز نسبت به بیماریزایی این نژادها حساس است. جهت تعیین محل ژن و یا ژنهای موثر در مقاومت این لاین به نژاد Ug99، واکنش نسلهای F₂ و F₃ جمعیت ژنتیکی حاصل از تلاقی لاین Tr129 با لاین RL6071، بعنوان لاین حساس نسبت به زنگ سیاه سنجیده شد. با توجه به قرنطینه بودن نژاد Ug99 در کشور کانادا و نیاز به امکانات و گلخانه های ویژه کنترل شده جهت مایه کوبی با اسپورهای نژاد Ug99 والدین جمعیت با نژادهای موجود محلی مایه کوبی شدند و بر اساس نتایج بدست آمده از واکنش افتراقی قابل ملاحظه والدین جمعیت نسبت به نژاد MCF، از این نژاد جهت مایه کوبی کل جمعیت ژنتیکی استفاده شد. روشهای مایه کوبی جمعیت، رتبه بندی گسترش بیماری، استخراج دی ان آ از گیاه و مکان یابی کروموزومی ژن یا ژنهای مقاومت، و رسم نقشه های لینکاژی مشابه متدها و روشهای شرح داده شده در قسمتهای قبل بود. تنها تفاوت قابل ذکر این بود که با توجه به تفرق ۱۵:۱ مشاهده شده در جمعیتهای ژنتیکی F₂ و F₃ مورد مطالعه، وجود دو ژن غالب برای القای مقاومت به نژاد MCF در لاین Tr129 به اثبات رسید و جهت رسم نقشه ژنتیکی ژنهای مزبور از روش ابداعی تجزیه هاپلوتایپی (Haplotype analysis) و مدل سازی ژنتیکی برای ترسیم همزمان نقشه ژنتیکی دو ژن مقاومت استفاده شد که روش مذکور در مقاله جداگانه ای بطور مبسوط تشریح گردیده و در این مقاله فقط به درج خلاصه ای از نتایج حاصل اکتفا می شود.

نتایج و بحث

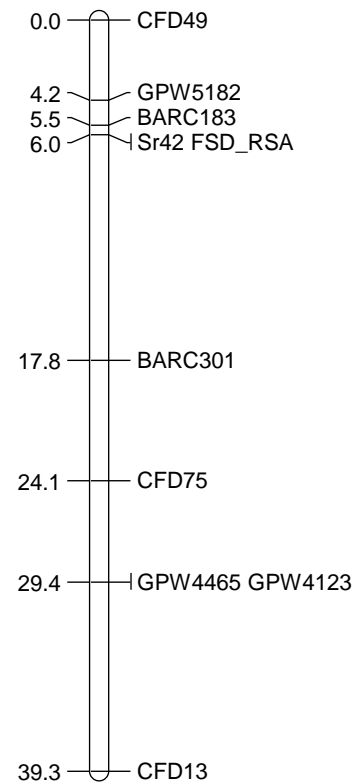
۱. جمعیت ژنتیکی Norin 40/LMPG-6

الف. ترسیم نقشه ژنی *Sr42*: در مجموع از ۲۴۸ لاین مورد بررسی در جمعیت مورد مطالعه برای مقاومت به نژاد TTKSK (Ug99) ۱۱۸ لاین واکنش مقاوم و ۱۳۰ لاین واکنش حساس داشتند و آزمون تطابق کای دو احتمال معنی داری تفرق ۱:۱ جمعیت (تفرق برای یک ژن) را تایید نمود ($\chi^2_{1:1} = 0.58, p = 0.45$).

والدین جمعیت با ۶۶ مارکر ریزماهواره که قبلا محل قرار گرفتن آنها بر روی کروموزوم 6D تعیین شده بود مورد آزمایش قرار گرفتند که از میان آنها حدود ۴۰ مارکر حالت چند شکلی نشان دادند و ۱۲ مارکر که پوشش خوبی برای کل کروموزوم 6D داشتند انتخاب شدند و برای غربال کلیه لاینهای جمعیت ژنتیکی مورد ارزیابی از این مارکرها استفاده شد. نتایج نشان داد که سه مارکر انتهایی بر روی بازوی کوتاه کروموزومی 6D یعنی BARC183، GPW5182 و CFD49 نزدیکترین مارکرها به محل ژن *Sr42* بودند و لذا با غربال نمودن لاینهای جمعیت دابل هاپلوئید با مارکهای ژنتیکی بیشتر در این قسمت از کروموزوم، اقدام به رسم نقشه ژنتیکی دقیقتر این ژن شد. در مجموع از ۸ مارکر ریزماهواره و یک مارکر (FSD_RSA) PCR برای رسم نقشه ژن *Sr42* استفاده شد (شکل ۲). مارکر FSD_RSA تفرق کاملا همسانی را با ژن *Sr42* نشان داد که نشان دهنده پیوستگی کامل و یا بسیار نزدیک این مارکر با ژن مورد نظر بود. مارکهای BARC183



و GPW5182 در فاصله های بسیار نزدیکی (بترتیب ۰,۵ و ۱,۸ سانتی مورگان از ژن) و در قسمت نزدیک به تلومر قرار گرفته ولی نزدیکترین مارکر در قسمت نزدیک به سنترومر مارکر BARC301 با فاصله ۱۱,۸ سانتی مورگان بود. با توجه به وجود آللهای همشکل برای کلیه مارکرهای ریزماهواره آزمایش شده موجود در بین ژن *Sr42* و *BARC301*, امکان پیدا کردن مارکرز نزدیکتری در قسمت نزدیک به سنترومر ژن وجود نداشت. در هر حال، مارکرهای



شکل ۲. نقشه پیوستگی ژنتیکی ژن مقاومت به زنگ سیاه *Sr42* در روی کروموزوم 6DS رقم نورین ۴۰.

FSD_RSA و *BARC183* و *GPW5182* مارکرهای بسیار خوبی برای استفاده در گزینش با استفاده از نشانگرها (MAS) می باشند. ژن *Sr42* دقیقاً در محلی قرار گرفته است که قبلاً ژن *SrCad* گزارش شده بود (6) و به احتمال بسیار زیاد ژن *SrCad* همان ژن *Sr42* است که بصورت ناشناخته در تعدادی از ارقام گندم کانادایی موجود بوده است (3). از مهمترین مزیت های ژن *Sr42* این است که این ژن دارای منشا گندم زراعی است و انتقال آن به ارقام زراعی بسیار آسان و بدور از ریسک انتقال ژنهای ناخواسته به ژرم پلاسما سازگار خواهد بود. از دیگر مزیت های *Sr42* می توان به مقاومت موثر این ژن نسبت به بیشتر نژادهای لینه *Ug99* بغیر از دو نژاد TRTTF و TRTTF که دارای گسترش و نیز اهمیت کمتری نسبت به نژادهای دیگر لینه *Ug99* می باشند اشاره کرد (3). مارکرهای ژنتیکی کاملاً پیوسته و یا بسیار نزدیک به ژن *Sr42* می توانند باعث تسریع در انتقال سریع و مطمئن این ژن به ارقام تجارتي حساس گندم در سراسر دنیا شوند. با توجه به اینکه در حال



حاضر انتقال این ژن به گندمهای با تیپ بهاره انجام شده، این موضوع نیز می تواند باعث سرعت بخشیدن انتقال این ژن به ارقام الیت و هرمی نمودن مقاومت این ارقام به نژادهای لینه Ug99 شود.

ب. ترسیم نقشه ژنی ژن جدید (*Sr54*): با توجه به فنوتیپ مقاوم یا حساس گیاهان جمعیت، لاین های دابل هاپلوئید مطابقا تیپهای آلودگی مشابه با یکی از والدین مقاوم و یا حساس را نشان دادند. تیپ آلودگی لاین نورین ۴۰ در تکرارهای مختلف از 1^- تا 1^+ و لاینهای دابل هاپلوئید مقاوم دارای تیپ آلودگی از 1^- تا 11^+ بودند. تیپ آلودگی لاین LMPG برابر 3^+3^+ و لاینهای دابل هاپلوئید حساس دارای تیپ آلودگی از 33^+ تا 4 بودند. از تعداد ۲۶۷ لاین مورد آزمایش ۱۳۶ لاین واکنش مقاوم و ۱۳۱ لاین واکنش حساس نشان دادند و آزمون تطابق کای دو احتمال معنی داری تفرق ۱:۱ جمعیت (تفرق برای یک ژن) را تایید نمود ($\chi^2_{1:1} = 0.093, p = 0.760$).

برای تعیین محل کروموزومی ژن مقاومت، چنین فرض شد که هر مینی بالک می تواند دارای سه وضعیت مختلف برای هر یک از نشانگرهای ریز ماهواره باشد: ۱. فقط آلهای والد مقاوم را داشته باشد. ۲. فقط آلهای والد حساس را دارا باشد. و ۳. آلهای هر دو والد مقاوم و حساس را داشته باشد. تعداد بالکهای مشابه با هر یک از حالتهای فوق برای هر نشانگر شمارش و محاسبه گردید و فرض شد که مارکرهای پیوسته به ژن مقاومت دارای تعداد بیشتری از بالک هایی باشند که فقط آل والد مقاوم را نشان می دهند و بالعکس مارکرهای ناپیوسته با ژن مقاومت دارای توزیع تصادفی آلهای هر دو والد در هر یک از مینی بالکها و همچنین در همه ۱۴ مینی بالک بکار گرفته شده خواهند بود. مدل سازی ژنتیکی روش تجزیه تفرقی بالکهای چندگانه نشان داد که برای انتخاب دقیق نشانگرهای پیوسته با مقاومت، حداقل چهار ویاتعداد بیشتری از مینی بالکها باید فقط دارای آلهای والد مقاوم باشند. با در نظر گرفتن این حداقل، برای مارکرهایی که پیوسته نیستند (دارای ۵۰٪ نوترکیبی) احتمال اشتباه نوع اول (انتخاب مارکر بعنوان مارکر پیوسته) فقط ۰٫۷٪ در هر ۱۰۰ مارکر ناپیوسته است. برای مارکرهای کاملا پیوسته تا با ۱۰٪ نوترکیبی، با انتخاب این حداقل مینی بالک احتمال اشتباه نوع دوم (عدم انتخاب مارکر بعنوان مارکر پیوسته) صفر است. برای مارکرهایی با ۱۰٪ و ۲۰٪ نوترکیبی احتمال اشتباه نوع دوم بترتیب برابر ۴٫۲٪ و ۱۲٫۲٪ است و حتی برای مارکرهایی با نسبت ۳۰٪ نوترکیبی نزدیک به ۵۰٪ است (محاسبات نشان داده نشده اند).

از ۴۲۳ نشانگر ریز ماهواره مورد استفاده ۲۵۶ نشانگر (۶۰٫۵٪) در بین والدین چندشکلی نشان دادند. این تعداد نشان دهنده میانگین تقریبی ۱۲٫۲ مارکر دارای چند شکلی در روی هر کروموزوم بود که بیانگر پوشش خوبی برای کلیه کروموزومهای گندم بود. مطابق با آنچه در مدل سازی این روش بالک چندگانه بدست آمد، اگر برای یک نشانگر آلهای والد مقاوم در چهار (و یا بیشتر) از مینی بالکها مشاهده گردید آن نشانگر بعنوان نشانگر امیدبخش شناخته شد (شکل ۳). با استفاده از این معیار کروموزومهای 2D و 5D دارای حداقل یک مارکر دارای شرط فوق الذکر بودند (جدول ۳). از این مارکرهای امیدبخش برای غربال کردن ۹۶ لاین دابل هاپلوئید با فنوتیپ مشخص استفاده شد تا محل کروموزوم ژن مقاومت به نژاد LCBB زنگ سیاه تعیین شود. نتایج بیانگر این بود که فقط نشانگرهای موجود بر روی بازوی بلند کروموزوم 2D با ژن مربوطه پیوسته بودند. در مرحله بعدی کلیه لاینها (۲۶۷ لاین) با این نشانگرها و نشانگرهای بیشتری بر روی بازوی بلند کروموزوم 2D آزمایش شدند و نتایج نشان دهنده قرار داشتن ژن مقاوم بر روی این کروموزوم بود (شکل ۴). بطور کلی در عمل دامنه استفاده از روش کلاسیک تجزیه تفرقی بالکها کمتر از محدوده تئوریک این روش می باشد. بعنوان مثال این روش برای ترسیم نقشه ژنتیکی ژن مقاومت به زنگ سیاه *SrCad* استفاده شد ولی فاقد کارایی لازم برای تشخیص محل ژن مزبور بود و لذا از روش غربالگری ارزیابی کل ژنوم استفاده شد تا محل این ژن در روی کروموزوم 6DS شناسایی شود (6). نکته قابل توجه این بود که در تحقیق مذکور نشانگر مولکولی CFD49 که تنها ۷ سانتی مورگان از محل ژن *SrCad* فاصله داشت یکی از نشانگرهای بکار رفته در غربال بالکهای مقاوم و حساس بود، ولی حتی این نشانگر رابطه معنی داری را برای تمایز آلهای دو والد حساس و مقاوم که نشان دهنده پیوستگی آنها با ژن مقاومت باشد نشان نداد. پیدا نمودن پیوستگی ژنتیکی بین نشانگرهای مولکولی و ژنهای مورد علاقه در فواصلی حتی بیشتر از ۲۰



سانتی مورگان در روش ابداعی تجزیه تفرقی بالکهای چندگانه بیانگر سودمندی نسبی این روش نسبت به روش کلاسیک تجزیه تفرقی بالکها است.

نکته قابل توجه در مورد ژن جدید مقاومت به زنگ سیاه تفرق یکسان این ژن با تعداد زیادی از نشانگرهای ریز ماهواره بود که بیانگر پیوستگی کامل این ژن با این نشانگرها بود. بعبارت دیگر در قطعه ای به طول تقریبی ۲۵ سانتی مورگان در روی بازوی بلند کروموزوم 2D هیچ گونه نوترکیبی بین نشانگرهای ریز ماهواره و ژن مقاومت به زنگ سیاه مشاهده نشد. تعداد زیادی از این نشانگرها فاقد هر گونه آلی برای رقم نورین ۴۰ بودند (آلهای نول در حالت کوپلینگ با ژن مقاومت بودند). فقدان آلهای نشانگرهای ریز ماهواره های اختصاصی گندم همراه با عدم وجود کراسینگ اوور در طول این قطعه بیانگر این نکته بود که با احتمال قریب به یقین این بلوک پیوسته از طریق آمیزش خویشاوندان وحشی گندم با گندم زراعی به ژنوم آن وارد شده و به ارث رسیده است زیرا انجام کراسینگ اوور و نوترکیبی بین کروموزومهای هومولوگ گندم و خویشاوندان وحشی گندم امری نادر است (2, 14, 15)

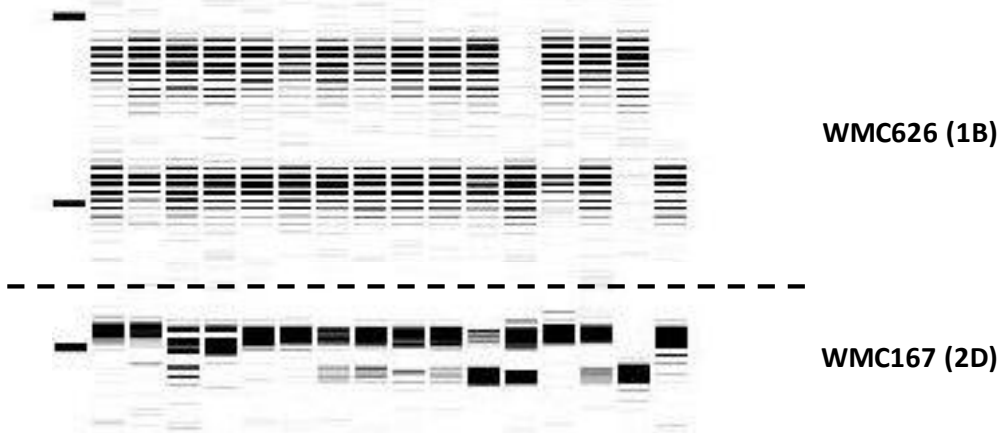
جدول ۳. تعداد مینی بالکهای دارای آلهای والد مقاوم، آلهای والد حساس و یا آلهای هر دو والد مقاوم و حساس، تکثیر شده با نشانگرهای امید بخش موجود در روی کروموزومهای 2D و 5D و

فاصله نشانگرهای پیوسته با محل ژن

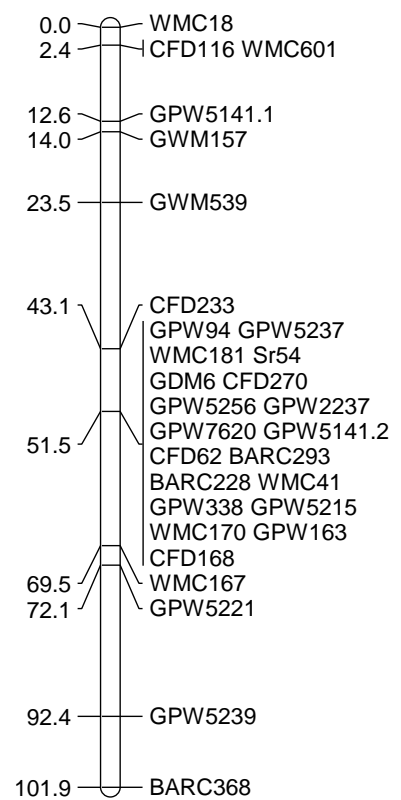
نشانگر	کروموزوم	فاصله تا ژن	تعداد مینی بالکها		
			R	H	S
gpw320	5D	غیر پیوسته	۴	۹	۱
wmc18	2D	~40 cM	۵	۸	۱
wmc601	2D	~40 cM	۵	۸	۱
wmc167	2D	20 cM	۶	۸	صفر



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 S R



شکل ۳. مقایسه توزیع آللهای نشانگرهای ریز ماهواره ناپیوسته (WMC626 در روی کروموزوم 1B) و پیوسته (WMC167 در روی کروموزوم 2D) با ژن مقاومت به زنگ سیاه در مینی بالکهای شامل DNA چهار لاین دابل هاپلوئید مقاوم



شکل ۴. نقشه پیوستگی ژنتیکی ژن مقاومت به زنگ سیاه Sr54 در روی کروموزوم 2DL رقم نورین ۴۰. ژن Sr54 با هجده مارکر



ریزمهواره پیوستگی کاملی داشت که این مارکرها طولی معادل ۲۵ سانتی مورگان از کروموزوم 2DL رقم نورین ۴۰ را پوشش می دهند.

در اغلب موارد یک قطعه وارد شده از یک خویشاوند وحشی به صورت بازدارنده نوترکیبی^۱ عمل می کند و کراسینگ اوور در منطقه ژن مورد نظر به چشم نمی خورد (5). اگرچه تمام نشانگرهای کاملاً پیوسته با ژن *Sr54* می توانند بعنوان بهترین نشانگرها در تشخیص ردگیری و وجود و یا عدم وجود این ژن در جمعیت‌های اصلاحی بکار گرفته شوند به علت احتمال حضور ژنهای نامطلوب در بلوک ژنی ۲۵ سانتی مورگان در اثر کشش لینکاژی^۲ نیاز به شکستن این بلوک و کوچکتر نمودن قطعه دی ان ا انتقال یافته از خویشاوندان وحشی حامل ژن می باشد.

تاکنون هیچ ژن مقاومت به زنگ سیاه در روی کروموزوم 2D گندم گزارش نشده و با توجه به ترسیم نقشه لینکاژی دقیق این ژن در روی این کروموزوم درخواست نامگذاری این ژن از کمیته نامگذاری ژنهای مقاومت به آزمایشات تکمیلی نشان داد که این ژن در برابر ویروانس اکثر نژادهای پوکسینیا گرامینیس غالب در قاره آمریکای شمالی مقاومت نداشته و از لحاظ طیف مقاومت عموماً ژن ضعیفی محسوب می شود. همچنین نژاد LCBB بیشتر به عنوان نژاد غیرویروولانت بر روی اکثر ژنهای زنگ سیاه گندم و در نتیجه اکثر گندمهای تجارتي موجود در آمریکای شمالی محسوب می شود. در آزمایش دیگری عکس العمل ژن مزبور به نژادهای زنگ قهوه ای

۱. Recombination suppressor. ۲. Linkage drag

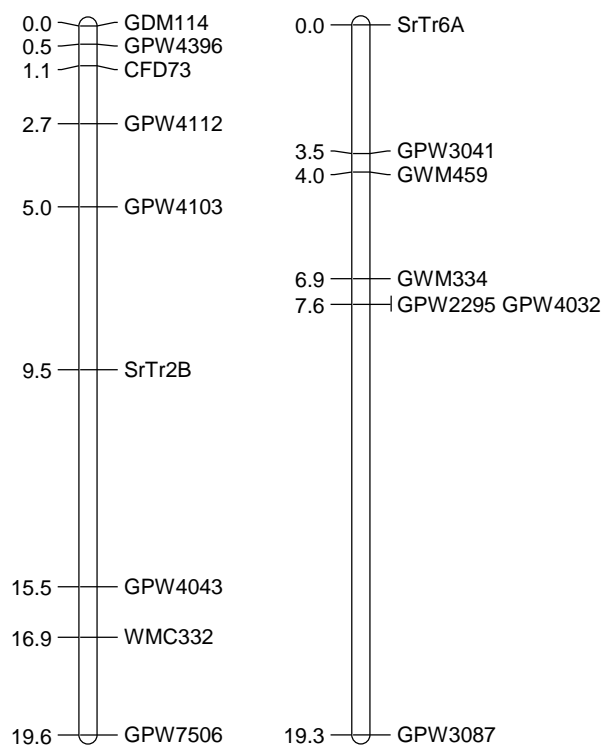
Puccinia striiformis f. sp. tritici) غالب در کانادا سنجیده شد که واکنش حساسی به این نژادها دیده شد (نتایج نشان داده نشده اند). اگرچه این نتایج ممکن است در عمل مانعی برای استفاده گسترده از این ژن در واریته های تجارتي گندم در آمریکای شمالی باشد، احتمال موثر بودن این ژن در برابر ویروانس نژادهای زنگ سیاه (و یا سایر زنگها) در سایر نقاط دنیا و یا نژادهای جدید پاتورژن با ویروانس متفاوت دور از ذهن نیست. بعنوان مثال ژن *Sr42* در رقم نورین ۴۰ که واکنش حساسی نسبت به بسیاری از نژادهای بیماریزای زنگ سیاه در آمریکای شمالی داشت و به همین جهت ژن بی اهمیتی برای اصلاح گندم در این قاره بود نسبت به نژاد TTKSK (Ug99) یا بسیاری از نژادهای مشتق شده از این نژاد مقاومت نشان داده (3) و این ژن که تا چندی پیش به ظاهر غیر موثر به نظر می آمد می تواند نقش ویژه ای برای کنترل نژاد Ug99 در کانادا و سایر نقاط جهان داشته باشد.

۲. جمعیت ژنتیکی RL6071/Tr129

با استفاده از متد ابداعی تجزیه هاپلو تایپی و مدل سازی ژنتیکی بر مبنای تجزیه ژنتیکی جمعیت های پایه F_2 و F_3 محل دو ژن موثر در مقاومت به نژاد MCCF بر روی کروموزومهای 6AS و 2BL تخمین زده شد. بر مبنای ژنوتیپ نزدیکترین مارکرها به دو ژن مستقر بر روی دو کروموزوم 2BL و 6AS در جمعیت F_2 پایه، دو خانواده $F_2:3$ که هر یک فقط برای ژن اول و یا فقط برای ژن دوم تفرق نشان می دادند انتخاب شدند. این انتخاب به گونه ای انجام شد که خانواده اول برای ژن 2B تفرق نشان داده (دارای ژنوتیپ $R_B r_B$ در گیاه والدی F_2) و فاقد ژن 6A (دارای ژنوتیپ $r_A r_A$ در گیاه والدی F_2) بود و خانواده دوم برای ژن 6A تفرق نشان داده (دارای ژنوتیپ $R_B r_B$ در گیاه والدی F_2) و فاقد ژن 2B (دارای ژنوتیپ $r_B r_B$ در گیاه والدی F_2) باشد. از تعداد ۱۶۰ لاین مورد بررسی در جمعیت اول ۱۲۷ لاین واکنش مقاوم و ۳۳ لاین واکنش حساس نسبت به مایه زنی با نژاد MCCF زنگ سیاه نشان داده و آزمون تطابق کای دو احتمال معنی داری تفرق ۳:۱ جمعیت را تایید نمود ($\chi^2_{3:1} = 1.63, p = 0.20$). همچنین از تعداد ۱۸۵ لاین مورد بررسی در جمعیت دوم



۱۴۱ لاین واکنش مقاوم و ۴۴ لاین واکنش حساس داشتند و در این جمعیت هم آزمون تطابق کای دوا احتمال معنی داری تفرق ۳:۱ جمعیت را تایید نمود ($\chi^2_{3:1} = 0.15, p = 0.70$). تعداد ۹ نشانگر بر روی کروموزوم 6A و ۱۶ نشانگر بر روی کروموزوم 2B در والدین حالت چندشکلی نشان داده و پس از استخراج دی ان ا افراد هر جمعیت، جمعیت‌های مزبور با این نشانگرها مورد آزمایش قرار گرفتند. غربالگری جمعیت‌های F_{2:3} اول و دوم با نشانگرهای فوق نشان داد که بترتیب ۶ مارکر بر روی کروموزوم 6AS و ۸ مارکر بر روی کروموزوم 2BL پیوستگی نزدیکی با ژنهای موجود بر روی هر یک از این کروموزومها داشته و لذا نقشه ژنتیکی دقیق هر یک از این ژنها در روی کروموزومهای مذکور ترسیم گردیده و ژنهای مذکور بترتیب موقتا بعنوان *SrTr6A* و *SrTr2B* نامگذاری شدند (شکل ۵). با استفاده از تست لاین های F_{2:3} که فقط ژن *SrTr2B* یا ژن *SrTr6A* را حمل می کردند با نژادهای مختلف زنگ سیاه اعم از نژادهای محلی و نژادهای لینه Ug99 مشخص شد که ژنی که باعث مقاومت به نژادهای لینه Ug99 می شود ژن *SrTr6A* است و ژن *SrTr2B* واکنش حساسی نسبت به همه این نژادها دارد. نکته قابل توجه در مورد ژن *SrTr6A* این است که این ژن در روی بازوی کوتاه کروموزوم 6A قرار گرفته که تا کنون در روی این بازوی کروموزومی فقط آللهای ژن *Sr8* یعنی *Sr8a* و *Sr8b* که هیچ کدام نسبت به نژادهای لینه Ug99 مقاومت ندارند شناسایی شده اند (9). با توجه به اینکه ژن کشف شده در روی این بازو نسبت به کلیه نژادهای Ug99 واکنش



شکل ۵. نقشه پیوستگی ژنتیکی ژن مقاومت به زنگ سیاه *SrTr2B* در روی کروموزوم 2BL لاین Tr129 (شکل سمت چپ) و نقشه پیوستگی ژنتیکی ژن مقاومت به زنگ سیاه *SrTr6A* در روی کروموزوم 6AS لاین Tr129 (شکل سمت راست). مقاومی نشان می دهد می توان استنباط نمود که این ژن مقاومت ژن جدیدی بوده که به طیف گسترده ای از نژادهای زنگ سیاه اعم از نژادهای لینه Ug99 یا سایر نژادهای موجود مقاومت نشان داده و می تواند در آینده به عنوان یک منبع با ارزش در امر اصلاح گندمهای



زراعی بکار گرفته شود. نظر به این که این ژن دارای منشا غیرگندم زراعی است قبل از انتقال آن به ارقام زراعی باید سعی نمود که قطعه انتقالی تا حد ممکن کوچک شود تا از خطر انتقال ژنهای ناخواسته به ژرم پلاسما سازگار گندم جلوگیری شود.

نتایج این تحقیق نشان می دهد که ژن *SrTr6A* دارای موقعیت انتهایی در کروموزوم *6AS* بوده ولی ژن *SrTr2B* دارای موقعیت میانی در وسط کروموزوم *2BL* است. با توجه به اینکه انتقال میانی در جابه جایی قطعات دی ان آ خویشاوندان وحشی به گندم زراعی امری نادر است و در بیشتر موارد انتقال قطعات دی ان آ خارجی بصورت انتهایی است (2) در مورد منشا ژن *SrTr2B* تردیدهایی وجود دارد. تحقیقات بیشتر نشان می دهد که این ژن دقیقا در روی محلی از کروموزوم *2BL* قرار دارد که قبلا ژن *Sr9a* مکان یابی شده است. با استفاده از تست لاین های *F2:3* حامل ژن *SrTr2B* با نژادهای مختلف زنگ سیاه مشخص شد که ژن *SrTr2B* واکنشی شبیه به ژن *Sr9b* دارد. در هر صورت، هنوز جواب دادن به این سوال که آیا این ژن آلل *Sr9b*، یک آلل جدید دیگر ژن *Sr9*، و یا یک ژن جدید پیوسته با ژن *Sr9* است مشکل است و تحقیقات تکمیلی با استفاده از دورگ گیری ژنومی داخل سلولی یا (Genomic in situ hybridization) *GISH* بی ان آ گونه تریانسپالیس جهت ردیابی منشا هر یک از ژنهای *SrTr2B* و *SrTr6A* در دست اجرا است.

در مجموع یافته های این تحقیق شامل کشف و مکان یابی چهار ژن مقاومت به زنگ سیاه بود. موقعیت ژن *Sr42* که قبلا بر روی کروموزوم *6D* شناسایی شده بود بطور کاملا دقیقی تعیین و با مارکهای مولکولی کاملا پیوسته و یا بسیار نزدیکی محدود شد. این ژن به چندین نژاد غالب لینه *Ug99* مقاومت نشان داده و با استفاده از مارکهای پیوسته می توان به راحتی این ژن را به ارقام گندم حساس به *Ug99* منتقل نمود. با توجه به این که تا کنون فقط نژاد *TTKSK* لینه *Ug99* در ایران گزارش شده این ژن که مقاومت بسیار خوبی را به این نژاد اعطا می کند می تواند به عنوان یک منبع باارزش در اصلاح گندمهای داخلی مورد توجه قرار گیرد. ژن مقاومت به زنگ سیاه *SrTr6A* ژنی با طیف مقاومت گسترده بوده و علاوه بر مقاومت به کلیه نژادهای *Ug99* مقاومت خوبی نسبت به بسیاری دیگر از نژادهای قدیمی زنگ سیاه دارد. با وجود این که قطعه انتقال یافته از ژنوم خویشاوند وحشی حامل این ژن کوچک به نظر می رسد، باید قبل از استفاده گسترده از این ژن و انتقال آن به ارقام زراعی احتیاط لازم در رابطه با حذف ژنهای نامطلوب احتمالی پیوسته با این ژن مد نظر قرار گیرد. در هر حال، امکان استفاده مستقیم از این ژن در برنامه های اصلاحی گندم کشور نیز دور از ذهن نیست. ژنهای *Sr2*، *Sr25* و *Sr26* که همگی از خویشاوندان وحشی گندم و یا چاودار به گندم منتقل شده اند و پیوستگی آنها با ژن یا ژنهای نامطلوب موثر در کیفیت گندم مشخص گردیده در حال حاضر با توجه به مقاومت موثرشان به نژادهای *Ug99* در حال استفاده در بسیاری از نقاط جهان هستند (31).

بنابراین ژن *SrTr6A* نیز می تواند بطور موثری در برنامه های اصلاحی گندم در ایران مورد استفاده قرار گیرد و تحقیقات مقدماتی برای استفاده از این ژن در ارقام گندم تجارتي کشور آغاز گردیده است. ژن *Sr54* از لحاظ طیف مقاومت ژن ضعیفی محسوب می شود و همچنین واکنش حساسی نسبت به نژادهای *Ug99* نشان می دهد. با توجه به احتمال حضور ژنهای نامطلوب در بلوک ژنی ۲۵ سانتی مورگان که ژن *Sr54* نیز در روی آن قرار دارد قبل از استفاده از این ژن نیاز به شکستن این بلوک و کوچکتر نمودن قطعه دی ان آ انتقال یافته از خویشاوندان وحشی می باشد. بنابر این در حال حاضر شاید علاقه زیادی به استفاده از این ژن چه در برنامه های اصلاحی گندم چه در کشورهای دیگر دنیا و چه در ایران وجود نداشته باشد ولی این ژن می تواند بعنوان یک منبع بالقوه مقاومت به زنگ سیاه برای استفاده در آینده تلقی شود. با توجه به این که منشا ژن *SrTr2B* مشخص نیست فعلا معلوم نیست که آیا این ژن یک ژن جدید است و یا این که این ژن همان *Sr9b* است که در اثر تلقیح سنبله های لاین *Tr129* با گرده های ناخواسته به ژنوم این لاین وارد شده است. بهر حال، مارکهای مولکولی پیوسته با این ژن که در این تحقیق شناسایی شدند می توانند باعث تسهیل انتقال این ژن به لاین های الیت و تجارتي گندم در کشور شوند. مجموعه آلل های ژن *Sr9* بطور گسترده ای در ارقام تجارتي گندمهای کشور های پیشرفته دنیا در حال استفاده هستند ولی استفاده از این ژنها تا کنون در ارقام داخلی گندم گزارش نشده است.



با وجود این که تا کنون بیماری زنگ سیاه ناشی از نژاد Ug99 بطور گسترده ای در ایران مستقر نشده و بیماری فقط در بعضی از سالها بصورت لکه ای و نادر در بعضی مناطق دیده شده است، برای کاهش خطرات ناشی از اپیدمی ناگهانی این نژاد بهتر است ژنهای موثر بر علیه این نژاد را با برنامه های به نژادی به ارقام تجاری گندم مورد کشت و زرع زارعین کشور منتقل نمود. این امر می تواند به آسانی و در طی چند سال از طریق هرمی نمودن ژنهای موثری چون *Sr42* و *SrTr6A* که در این تحقیق مارکرهای مولکولی بسیار نزدیکی برای آنها شناسایی شدند و نیز ژنهای مقاومت به زنگ سیاه دیگر چون *Sr2* و *Sr25* که برای آنها هم مارکرهای مولکولی پیوسته بسیار نزدیکی وجود دارد (13, 16) و در حال حاضر از این ژنها در ارقام تجاری بسیاری از کشورهای منطقه شمال آفریقا و جنوب آسیا استفاده می شود، انجام شود.

References:

1. Fetch, T.G. 2009. Races of *Puccinia graminis* on barely, oat, and wheat in Canada in 2005. Can. J. Plant. Pathol. 31:74–79.
2. Friebe, B., Jiang, J., Raupp, W.J., McIntosh, R.A. and Gill, B.S. 1996. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. Euphytica 91: 59–87.
3. Ghazvini, H., Hiebert, C.W., Zegeye, T., Liu, S., Dilawari, M., Anderson, J.A., Rouse, M.N., 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. Ghazvini, H., Hiebert, C.W., Zegeye, T., Fetch, T. 2012. Inheritance of stem rust resistance derived from *Aegilops triuncialis* in wheat line Tr129. Can. J. Plant Sci. 92: (In press).
5. Gill, B.S., Friebe, B.R., and White, F.F. 2011. Alien introgressions represent a rich source of genes for crop improvement. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108:7657–7658.
6. Hiebert, C.W., Fetch, T.G., Zegeye, T., Thomas, J.B., Somers, D.J., Humphreys, D.G., McCallum, B.D., Cloutier, S., Singh, D., Knott, D.R. 2011. Genetics and mapping of seedling resistance to Ug99 stem rust in Canadian wheat cultivars 'Peace' and 'AC Cadillac'. Theor. Appl. Genet. 122:143–149.
7. Hiebert, C. W., Fetch, T.G. and Zegeye, T. 2010. Genetics and mapping of stem rust resistance to Ug99 in the wheat cultivar Webster. Theor. Appl. Genet. 121:65–69.
8. Hiebert, C., Thomas, J., McCallum, B. 2005. Locating the broad-spectrum wheat leaf rust resistance gene *Lr52* (*LrW*) to chromosome 5B by a new cytogenetic method. Theor. Appl. Genet. 110:1453-1457.
9. Jin, Y., Singh, R.P., Ward, R.W., Wanyera, R., Kinyua, M., Njau, P., Fetch, T., Pretorius, Z.A., 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.
10. Jin, Y., Szabo, L., Pretorius, Z.A., 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.
11. Jin, Y., Szabo, L., Rouse, M., Fetch, Jr. T., Pretorius, Z.A., 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
12. Kosambi, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. Ann. Eugen. 12:172–175.
13. Liu, S., Yu, L.X., Singh, R.P., Jin, Y., Sorrells, M.E., Anderson, J.A. 2010. Diagnostic and co-dominant PCR markers for wheat stem rust resistance genes *Sr25* and *Sr26*. Theor Appl Genet 120:691–697.



14. **Lukaszewski, A.J. and Curtis, C.A.** 1992. Physical distribution of recombination in the B-genome chromosomes of tetraploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 86: 121-127.
15. **Lukaszewski, A.J.** 1992. A comparison of physical distribution of recombination in chromosome 1R of diploid rye and in hexaploid triticale. *Theor. Appl. Genet.* 83: 1048-1053.
16. **Mago, R., Brown-Guedira, G., Dreisigacker, S., Breen, J., Jin, Y., Singh, R., Appels, R., Lagudah, E.S., Ellis, J., Spielmeier, W.** 2011. An accurate DNA marker assay for stem rust resistance gene *Sr2* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 122: 735-744.
17. **McIntosh R.A., Wellings C.R. and Park R.F.** 1995. Wheat rusts: an atlas of resistance genes. CSIRO Publications, East Melbourne, pp 85-141.
18. **Michelmore, R.W., Paran, I. and Kesseli, R.V.** 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:9828-9832.
19. **Nazari, K., Mafi M., Yahyaoui, A., Singh, R.P., Park, R.F.** 2009. Detection of wheat stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) race TTKSK (Ug99) in Iran. *Plant Dis.* 93:317.
20. **Pallotta, M.A., Warner, P., Fox, R.L., Kuchel, H., Jefferies, S.J., Langridge, P.** 2003. Marker assisted wheat breeding in the southern region of Australia. In: Pogna, N.E., Romano, M., Pogna, E.A., Galerio, G. (eds). Proceedings of 10th International Wheat Genet. Symposium, Instituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Rome, pp 789-791.
21. **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
22. **Peterson, B.** 1958. Wheat rust epidemics in western Canada in 1953, 1954, and 1955. *Can. J. Plant Sci.* 38:16-28.
23. **Pretorius, Z.A., Szabo, L.J., Boshoff, W.H.P., L.Herselman, L., Visser, B.** 2012. First report of a new TTKSF race of wheat stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) in South Africa and Zimbabwe. *Plant Dis.* 96: 590.
24. **Pretorius, Z.A., Singh, R.P., Wagoire, W.W., Payne, T.S.** 2000. Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* in Uganda. *Plant Dis.* 84:203.
25. **Röder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M., Leroy, P., Ganal, M.W.** 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007-2023.
26. **Roelfs, A.P., Martens, J.W.** 1988. An international system of nomenclature for *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology* 78:526-533
27. **Saari E.E., Prescott J.M.** 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
28. **Sears, E.R.** 1944. Cytogenetic studies with polyploid species of wheat. II. Additional chromosomal aberrations in *Triticum vulgare*. *Genetics* 29:237-247.
29. **Sears, E.R.** 1966. Chromosome mapping with the aid of telocentrics, p.370-381. In: J. MacKey (Ed). *Proc. 2nd Int. Wheat Genet. Symp. Hereditas Suppl. Vol. 2*, Lund, Sweden.
30. **Singh, M.P.** 1967. Monosomic analysis in wheat. *Heredity* 22:591-596.
31. **Singh, R.P., Hodson, D.P., Huerta-Espino, J., Jin, Y., Bhavani, S., Njau, P., Herrera-Foessel, S., Singh, P.K., 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.* 49:13.1-13.17.
32. **Singh, R.P., Hodson, D.P., Huerta-Espino, J., Jin, Y., Njau, P., Wanyera, R., Herrera-Foessel, S.A., Ward, W.R.** 2008. Will stem rust destroy the world's wheat crop? *Adv. Agron.* 98:271-309.
33. **Somers, D.J., Isaac, P., Edwards, K.** 2004. A high density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 109:1105-1114.



34. Sourdille, P., Singh, S., Cadalen, T., Brown-Guedira, G.L., Gay, G., Qi, L., Gill, B.S., Dufour, P., Murigneux, A., Bernard, M. 2004. Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Funct. Integr. Genomics* 4:12–25.
35. Stakman, E.C., Harrar, J.G. 1957. Principles of plant pathology. Ronald Press. New York. 581 p.
36. Stakman, E.C., Stewart, D.M., Loegering, W.Q. 1962. Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. USDA Agricultural Research Service E617.
37. Wanyera, R., Kinyua, M.G., Jin, Y., Singh, R.P. 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
38. Xu, S.S., Jin, Y., Klindworth, D.L., Wang, R.R.-C. and Cai, X. 2009. Evaluation and Characterization of Seedling Resistances to Stem Rust Ug99 Races in Wheat–Alien Species Derivatives. *Crop Sci.* 49:2167–2175.

Emergence and current status of Ug99 races of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and overview of recent progresses in deployment of stem rust resistance genes for effective control of disease

Abstract

Stem rust, caused by *Puccinia graminis* Pers.:Pers. f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn. (Pgt), is a disease of wheat that can cause devastating grain yield losses. Deployment of effective stem rust resistance (Sr) genes in wheat breeding programs and their introgression into wheat cultivars has had a significant impact on reducing incidence of stem rust to almost nonexistent levels in various countries for over four decades so that stem rust started to become a forgotten curse. In 1998, virulence to *Sr31* was detected in nurseries in Uganda which was caused by a new *Puccinia graminis* race and in 1999 the isolate was designated as Ug99. The pathogen has continued to evolve rapidly and other variants of the Ug99 race lineage with varying virulence have been recently reported in different parts of Africa. The Ug99 races possessing virulence to most of the wheat cultivars which are currently cultivated across the world and therefore they become a potential threat to wheat production worldwide. Discovering and transferring new Sr genes to wheat cultivars and pyramiding effective resistance genes in elite wheat germplasm has been an effective approach to mitigate stem rust damage caused by new virulent Pgt races. In this study, emergence and distribution of Ug99 races of *Puccinia graminis* will be reviewed and a summary of recent progresses in exploring and mapping of some new stem rust resistance genes will be presented.