

ارزیابی جمعیت‌های *Triticum dicoccoides* برای ژن مقاومت به

زنگ زرد Yr15 با استفاده از نشانگر اختصاصی SC792

بابک عبدالحی مندولکانی^{۱*}، محمدرضا بی‌همتا^۲، محمدرضا نقوی^۳

۱- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه ارومیه

۲و۳- استادان گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: b.abdollahi@urmia.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۸/۱۲/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۹)

چکیده

زنگ زرد (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*) از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی گندم است که در بیش از ۶۰ کشور جهان گزارش شده است. گندم وحشی تتراپلوئید امر (*Triticum dicoccoides*) بعنوان یکی از اجداد گندم زراعی، از منابع با ارزش ژن‌های مقاومت به زنگ زرد برای اصلاح گندم محسوب می‌شود. نمونه G₂₅ از این گونه دارای ژن Yr15 است که به ۳۱ نژاد زنگ زرد مقاومت نشان می‌دهد. این ژن با نشانگر مکان اختصاصی و همباز SC792 روی بازوی کوتاه کروموزوم 1B تفرق همزمان دارد. از این نشانگر به منظور بررسی وجود ژن Yr15 در ژنوتیپ‌های *T. dicoccoides* استفاده شد. از بین ۱۴۹ نمونه از ۱۶ جمعیت مورد مطالعه، ۴۴ ژنوتیپ دارای الل مقاومت بودند. ژنوتیپ‌های دو جمعیت Yehudiyya و Tabigha1 فراورده‌ای برای این نشانگر تکثیر نکردند. نتایج نشان داد که نشانگر SC792 دارای پنج الل در جمعیت‌های مورد مطالعه است و به عنوان یک نشانگر چنداللی تایید شد. تمامی ژنوتیپ‌هایی که از جمعیت‌های Hermon و Roshpinna بر اساس آزمون پاتولوژیکی نشان داده شده بود که فنوتیپ مختص به ژن Yr15 را ایجاد می‌کنند الل مقاومت نشانگر SC792 را نشان دادند و در نتیجه وجود ژن Yr15 در آنها تایید شد. بر اساس نتایج حاصل پیشنهاد می‌شود از این نشانگر برای هرم سازی این ژن با دیگر ژن‌های مقاومت برای ایجاد ارقام مقاوم به زنگ زرد در برنامه‌های به‌نژادی گندم استفاده شود.

واژه‌های کلیدی

زنگ زرد،
ژن Yr15،
نشانگر SC792،
Triticum dicoccoides

مقدمه

گندم مهم‌ترین محصول غذایی در جهان است که تقاضا برای آن در سال ۲۰۲۰ میلادی به مقدار ۴۰ درصد بیش از مقدار فعلی پیش‌بینی شده است (۱). از سوی دیگر منابع در دسترس برای افزایش تولید در گندم محدود است. در حال حاضر در کشورهای در حال توسعه تلاش زیادی برای افزایش تولید گندم بعمل می‌آید که از نظر اهمیت همانند کوشش‌های سه دهه پیش و دوران آغاز انقلاب سبز می‌باشد (۱). تنش‌های زنده از جمله زنگ‌ها باعث کاهش عملکرد گندم می‌شوند. زنگ زرد که عامل آن قارچ *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* است، مهم‌ترین بیماری گندم در نواحی خنک و مرطوب محسوب می‌شود. کاهش تقریبی ۴۰ درصدی عملکرد گندم در اثر این بیماری معمول است (۷). در ایران در ۸۰ درصد از کل زمین‌های کشت گندم (۴/۴ میلیون هکتار) امکان بروز اپیدمی زنگ زرد وجود دارد (۲۱).

موثرترین راهکار ایجاد مقاومت به زنگ زرد استفاده از ژن‌های مقاومت تمام مرحله‌ای (گیاهچه‌ای) در رقمی با زمینه متوسطی از مقاومت کمی است (۲). گندم تتراپلوئید وحشی *Triticum dicoccoides* یکی از غنی‌ترین ذخایر ژنتیکی مقاومت به زنگ زرد می‌باشد. بیشتر نواحی پراکنش جغرافیایی *T. dicoccoides* مناطقی از ایران، عراق، ترکیه، فلسطین اشغالی و سوریه می‌باشد (۱۱). در ارزیابی مزرعه‌ای و گلخانه‌ای جمعیت‌های مختلف *T. dicoccoides* از فلسطین اشغالی برای مقاومت به زنگ زرد، یکی از نمونه‌های بسیار مقاوم این گونه به نام G₂₅ از جمعیت Roshpinna شناسایی شد که حامل ژن غالب *Yr15* بود (۱۱). آزمون‌های پاتولوژیکی مقاومت بالای آن را در مراحل گیاهچه‌ای و بلوغ به زنگ زرد نشان داد (۱۰، ۱۱ و ۱۲). با انتقال این ژن به گندم تتراپلوئید و هگزاپلوئید زراعی، مقاومت آن به ۳۱ نژاد زنگ زرد از کشورهای مختلف تایید شد (۱۰، ۱۲). مطالعات سیتوژنتیکی نشان داد که این ژن روی بازوی کوتاه کروموزوم 1B قرار دارد (۱۶). با مکان‌یابی اولیه این ژن، دو نشانگر RAPD و RFLP به ترتیب در فاصله ۲۷ و ۱۱ سانتی‌مورگانی آن شناسایی شد (۲۲). در ادامه این مطالعات وجود دو نشانگر RAPD و SSR در فاصله ۱۲ سانتی‌مورگانی از این ژن تایید شد (۶). در مکان‌یابی

مجدد این ژن و ژن *YrH52* معلوم شد که به دلیل کوچک بودن اندازه جمعیت مورد استفاده، ترتیب و فاصله نشانگرها با مطالعات قبلی مطابقت نداشته و برای مکان‌یابی دقیق‌تر این ژن‌ها به جمعیت‌های بزرگتر نیاز می‌باشد (۲۰). در مکان‌یابی دقیق این ژن با استفاده از یک جمعیت F₂ شامل ۸۲۵ فرد حاصل از تلاقی لاین‌های تقریباً ایزوژنیک B₉ و B₁₀ (این لاین‌ها دارای ژن *Yr15* در زمینه ژنتیکی DW1 هستند) با لاین DW1 (فاقد ژن *Yr15*)، نشانگر SC792 به عنوان یک نشانگر مبتنی بر PCR، اختصاصی و همباز که با این ژن تفرق همزمان دارد معرفی شد (۳). ارزیابی این نشانگر روی ۶۱ لاین و رقم گندم نشان داد که این نشانگر قادر است نمونه‌های دارای ژن *Yr15* و فاقد آن را با دقت بالایی غربال سازد (۴). با توجه به اهمیت بیماری زنگ زرد در گندم، این تحقیق به منظور ارزیابی جمعیت‌های وحشی گندم تتراپلوئید *T. dicoccoides* با استفاده از نشانگر SC792 برای شناسایی نمونه‌های دارای ژن مقاومت به زنگ زرد *Yr15* جهت استفاده از آنها در برنامه‌های اصلاحی گندم طرح‌ریزی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: مواد گیاهی شامل ۱۴۹ نمونه از ۱۶ جمعیت وحشی گندم *T. dicoccoides* بود (جدول ۱) که توسط موسسه زیست فناوری دانشگاه هلسینکی فنلاند فراهم شد. از هر جمعیت ۱۰-۷ ژنوتیپ انتخاب شد. نمونه G₂₅ از *T. dicoccoides* (دارای ژن *Yr15*) و لاین DW1 (فاقد ژن *Yr15*) به عنوان شاهد برای ال-های مقاومت و حساسیت SC792 مورد استفاده قرار گرفتند. آزمون مقاومت و حساسیت (وجود یا عدم وجود ژن *Yr15*) در جمعیت‌های Hermon و Roshpinna با استفاده از نژاد 38E134 (این نژاد روی ژن‌های *Yr2*، *Yr6*، *Yr7* و *Yr9* بیماری‌زا و روی ژن‌های *Yr1*، *Yr3* و *Yr4* غیر بیماری‌زا می‌باشد) زنگ زرد در مرحله گیاهچه‌ای انجام شد (۱۰، ۱۲). در ارقام فاقد ژن اسپورها به وفور رشد نموده ولی در ارقام دارای ژن *Yr15* رشد اسپورها مشاهده نمی‌شد و لکه‌های کوچک که نشانگر واکنش فوق حساسیت بود دیده می‌شد.

گرفت (۱۴). تصویربرداری از ژل‌ها با استفاده از اسکنر FLA 5100 انجام شد.

نتایج و بحث

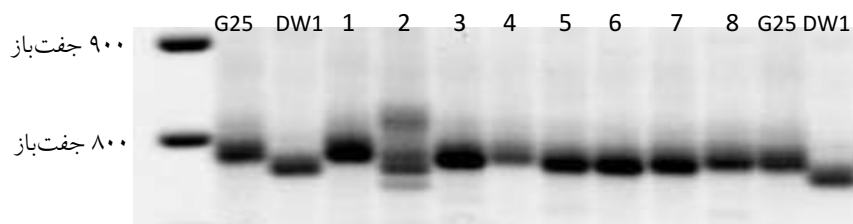
بررسی وجود و عدم وجود ژن *Yr15* در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از نشانگر SC792 نشان داد که از بین ۱۴۹ ژنوتیپ از ۱۶ جمعیت مورد مطالعه، ۴۴ ژنوتیپ دارای الی مقاومت این نشانگر هستند. در ژنوتیپ‌های دو جمعیت *Yehudiyya* و *Tabigha1* فراورده‌ای برای این نشانگر تکثیر نشد. برای حصول اطمینان از عدم وجود فراورده تکثیری این نشانگر در جمعیت‌های مذکور و بیشتر ژنوتیپ‌های جمعیت *Tabigha2*، واکنش زنجیره-ای پلیمرز ۳ بار تکرار شد و نتایج در همه تکرارها مشابه بود. ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس بر اساس الی‌های نشانگر SC792 برای هر جمعیت بطور جداگانه توضیح داده می‌شود. جمعیت *Hermon*: شکل ۱ نشانگر SC792 را در این جمعیت نشان می‌دهد. نشانگر اندازه مورد استفاده در همه ژل‌ها *GeneRules* است که دامنه‌ی ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ جفت باز را در بر می‌گیرد. ژنوتیپ‌های شماره ۱، ۳، ۴ و ۸ دارای الی‌های مقاومت

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: DNA ژنوتیپ‌ها طبق روش CTAB و با تیمار RNaseA استخراج شد (۵). کمیت و کیفیت DNA با نانودراپ اندازه‌گیری شد و DNA همه‌ی نمونه‌ها به غلظت ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر برای واکنش‌های PCR رقیق شدند. حجم واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ۲۰ میکرولیتر و شامل بافر یک برابر Biotools با ۲ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۰/۲۵ میکرومول از هراغازگر و یک واحد آنزیم تک پلی‌مرز (شرکت بیوتولز) در ترموسایلر PTC-100 Programmable Thermal Controller انجام شد. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۹۴ درجه به مدت ۴ دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه، سپس ۳۲ چرخه شامل ۹۴ درجه به مدت ۴۰ ثانیه (واسرشت‌سازی)، ۶۰ درجه به مدت ۴۰ ثانیه (اتصال آغازگرها)، ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه (بسط) و بسط نهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود. توالی آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت این نشانگر 5'-cttgaggcccaacaacgtc-3' و 5'-cacacacacactccccgaca-3' می‌باشد. محصول واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از ژل آگارز ۱/۸ درصد *Resolute line* (Biozyme) با ولتاژ ۶۰-۷۰ و بافر STBE یک برابر و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت

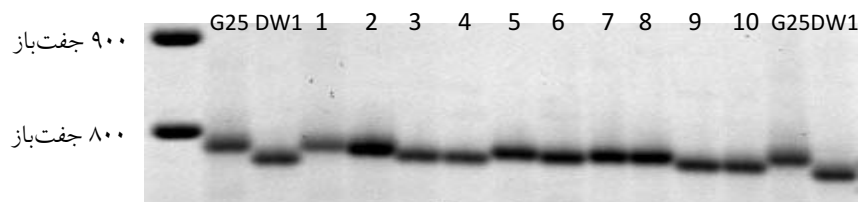
جدول ۱- تعداد و جمعیت‌های وحشی *Triticum dicoccoides* استفاده شده در این تحقیق

جمعیت*	تعداد	جمعیت	تعداد
Hermon	۸	Betoren	۱۰
Roshpinna	۱۰	Givat	۱۰
Tabigha1	۹	Gitit	۱۰
Batshelomo	۱۰	Jaba	۱۰
Gilboa	۷	Gamla	۹
Gerizim	۱۰	Turkey	۱۰
Kokav	۹	Yehudiyya	۸
Amirim	۱۰	Tabigha2	۹

* همه جمعیت‌ها بجز جمعیت *Turkey* (که از جنوب شرقی ترکیه جمع آوری شده بود) از فلسطین اشغالی جمع آوری شده بودند



شکل ۱- تصویر ژل مربوط به نشانگر SC792 در جمعیت Hermon (لاین G₂₅ و DW1 به ترتیب دارای ژن Yr15 و فاقد آن بوده و ال‌های مقاومت و حساسیت نشانگر SC792 را نشان می‌دهند)



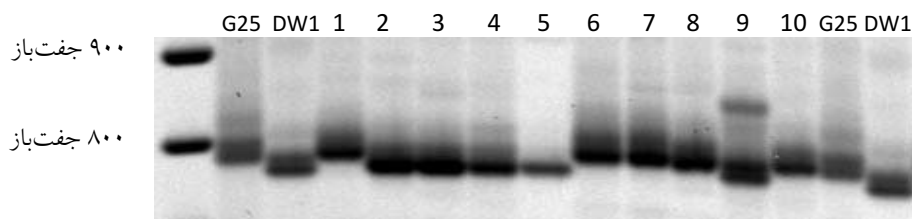
شکل ۲- تصویر ژل مربوط به نشانگر SC792 در جمعیت Roshpinna (لاین G₂₅ و DW1 به ترتیب دارای ژن Yr15 و فاقد آن بوده و ال‌های مقاومت و حساسیت نشانگر SC792 را نشان می‌دهند)

گزارش شده است (۸ و ۹). ژن *YrH52* (از ژن‌های مقاومت به زنگ زرد گندم) نیز در این جمعیت شناسایی شده است (۲۰). جمعیت *Roshpinna*: نمونه‌ی G₂₅ دارای ژن *Yr15* در این جمعیت شناسایی شده بود (۱۰، ۱۲). شکل ۲ نشانگر SC792 را در این جمعیت نشان می‌دهد. در این جمعیت ژنوتیپ‌های شماره ۳، ۴، ۶، ۹ و ۱۰ ال‌های شماره ۴ و ژنوتیپ‌های ۱، ۲، ۵، ۷ و ۸ ال‌های مقاومت را نشان دادند. این افراد بر اساس آزمون پاتولوژیکی نیز دارای این ژن بودند. بنابراین این جمعیت به غیر از ال‌های مقاومت یک ال‌ جدید (ال‌ ۴) نشان می‌دهد.

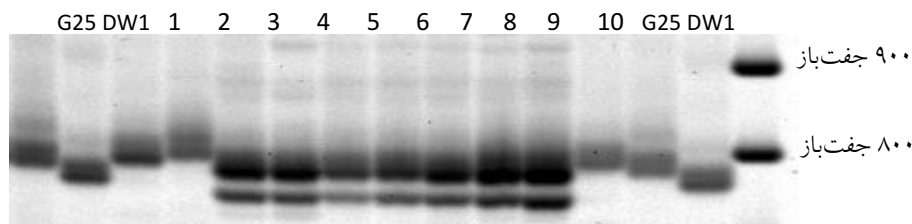
جمعیت *Tabigha1* فراورده‌ی تکثیری برای نشانگر SC792 نشان نداد. احتمالاً جهش بزرگی در ناحیه‌ی اتصال آغازگرها در این جمعیت رخ داده یا ممکن است قطعه‌ی بسیار بزرگی در ناحیه‌ی بین دو آغازگر درج شده باشد بطوری که فاصله‌ی بین آغازگرها قابل تکثیر نبوده است (۳، ۱۹).

جمعیت *Batshelomo*: این جمعیت ال‌ جدیدی را نشان نداد و همه‌ی ال‌ها شبیه ال‌های مقاومت و حساسیت والدین بود (شکل ۳). ژنوتیپ شماره ۹ در این جمعیت دارای نوار اضافی سنگین‌تری بود که با توجه به عدم وجود این نوار در جمعیت‌های دیگر و فاصله‌ی اندازه‌ای زیاد آن با دیگر نوارهای تکثیری، به نظر

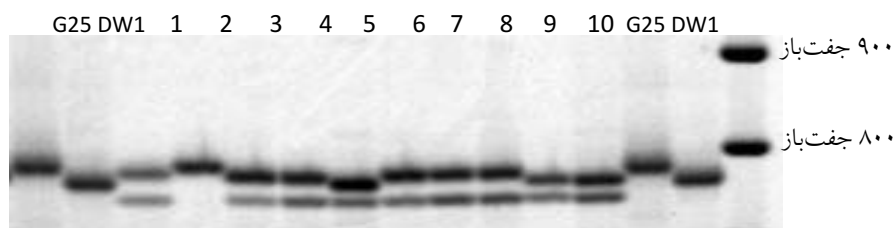
بودند. این افراد در آزمون پاتولوژیکی نیز دارای ژن *Yr15* بودند. افراد شماره ۵، ۶ و ۷ ال‌ی با تفاوت بسیار اندک با ال‌های مقاومت نشان دادند این افراد فاقد ژن *Yr15* بودند. فرد شماره ۲ هتروزیگوت بود و ۳ نوار در این مکان تکثیر کرد. با توجه به اینکه دو نوار نزدیک به هم و سبک‌تر، در جمعیت‌های دیگر نیز دیده می‌شد به نظر می‌رسد که نوار سنگین‌تر مربوط به گروه‌های همیولوگ یا حتی همولوگ دیگر باشد تکثیر چنین مکان‌هایی در گندم با توجه به وجود گروه‌های همیولوگ و حتی مضاعف-شدگی زیاد روی ژنوم B امکانپذیر است (۱۸). در بررسی ژرم پلاسماهای مختلف گندم برای وجود و عدم وجود مکان ژنی *Lr34/Yr18* با استفاده از نشانگر csLv34 نیز برخی ژنوتیپ‌ها الگوی ۳ نواری نشان دادند (۱۵). این جمعیت علاوه بر ال‌های والدینی دو ال‌ جدید نشان داد که با توجه به نتایج آزمون پاتولوژیکی، هر دو ال‌های مربوط به حساسیت می‌باشند. این ال‌ها به ترتیب ۳ (ال‌ موجود در فرد ۲) و ۴ (ال‌ موجود در افراد ۵، ۶ و ۷) نامیده شدند. ال‌های مقاومت و حساسیت موجود در والدین به ترتیب ال‌های ۱ و ۲ نام گرفتند. وجود چندین ال‌ مقاومت و حساسیت برای ژن‌های *Yr3* و *Yr4* نیز در گندم



شکل ۳- تصویر ژل مربوط نشانگر SC792 در جمعیت Batschelomo (لاین G₂₅ و DW1 به ترتیب دارای ژن *Yr15* و فاقد آن بوده و ال‌های مقاومت و حساسیت نشانگر SC792 را نشان می‌دهند)



شکل ۴- تصویر ژل مربوط به نشانگر SC792 در جمعیت Gilboa (لاین G₂₅ و DW1 به ترتیب دارای ژن *Yr15* و فاقد آن بوده و ال‌های مقاومت و حساسیت نشانگر SC792 را نشان می‌دهند)



شکل ۵- تصویر ژل مربوط به نشانگر SC792 در جمعیت Gerizim (لاین G₂₅ و DW1 به ترتیب دارای ژن *Yr15* و فاقد آن بوده و ال‌های مقاومت و حساسیت نشانگر SC792 را نشان می‌دهند)

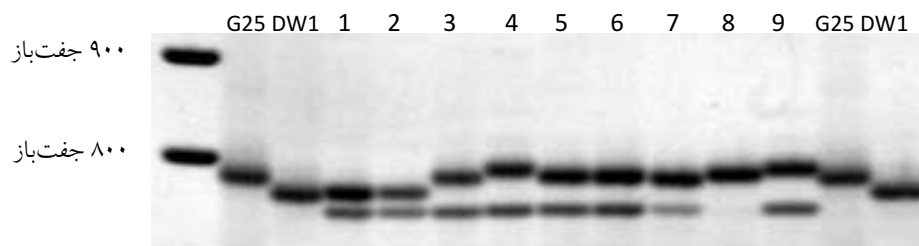
می‌رسد که مربوط به مکان دیگری باشد (۱۵).

جمعیت Gilboa: شکل ۴ نشانگر SC792 را در افراد این جمعیت نشان می‌دهد. در این جمعیت فقط ژنوتیپ شماره ۱ دارای ال مقاومت بود. افراد ۲ و ۱۰ ال‌های مشابه و جدیدی را نشان دادند که اندکی سنگین‌تر از ال مقاومت بوده و ال ۵ نام گرفت. افراد ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ هتروزیگوت بوده و ترکیبات الی ۳ و ۴ را نشان دادند. بنابراین این جمعیت ۳ ال جدید ۳، ۴ و ۵ را نشان داد.

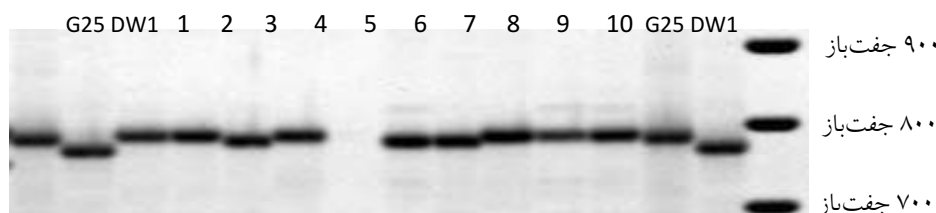
جمعیت Gerizim: در این جمعیت ژنوتیپ شماره ۲ هموزیگوت و دارای ال مقاومت شماره ۱ بود (شکل ۵). ژنوتیپ‌های ۱، ۳، ۴، ۶، ۷ و ۸ هتروزیگوت و ترکیب الی ۳ و ۴ و ژنوتیپ‌های ۵،

۹ و ۱۰ هتروزیگوت و ترکیب الی ۲ و ۳ را نشان دادند. این جمعیت ۲ ال جدید ۳ و ۴ و در کل دارای ۴ ال ۱، ۲، ۳ و ۴ بود.

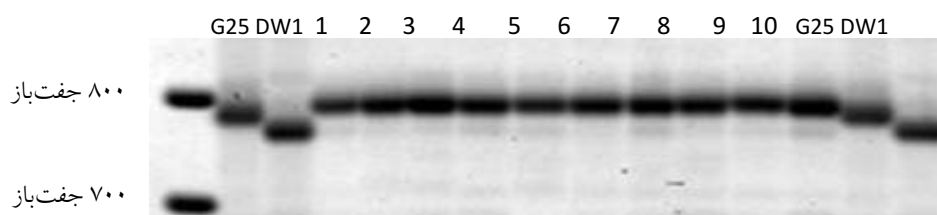
جمعیت Kokav: در این جمعیت ۹ فرد برای وجود و عدم وجود ژن *Yr15* با استفاده از نشانگر SC792 مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۶). در این جمعیت ژنوتیپ شماره ۸ هموزیگوت و دارای ال مقاومت بود. بقیه ژنوتیپ‌ها هتروزیگوت و ترکیبات الی ۲ و ۳ (ژنوتیپ‌های ۱ و ۲)، ۵ و ۳ (ژنوتیپ‌های ۴ و ۹) و یا ۱ و ۳ (ژنوتیپ‌های ۳، ۵، ۶ و ۷) را دارا بودند. این جمعیت در مجموع ۴ ال ۱، ۲، ۳ و ۵ را نشان داد.



شکل ۶- تصویر ژل مربوط به نشانگر SC773 در جمعیت Kokav (لاین G₂₅ و DW1 به ترتیب دارای ژن *Yr15* و فاقد آن بوده و ال‌های مقاومت و حساسیت نشانگر SC792 را نشان می‌دهند)



شکل ۷- تصویر ژل مربوط به نشانگر SC792 در جمعیت Amirim (لاین G₂₅ و DW1 به ترتیب دارای ژن *Yr15* و فاقد آن بوده و ال‌های مقاومت و حساسیت نشانگر SC792 را نشان می‌دهند)



شکل ۸- تصویر ژل مربوط به نشانگر SC792 در جمعیت Betoren (لاین G₂₅ و DW1 به ترتیب دارای ژن *Yr15* و فاقد آن بوده و ال‌های مقاومت و حساسیت نشانگر SC792 را نشان می‌دهند)

جمعیت Givat: در این جمعیت ژنوتیپ شماره ۵ هتروزیگوت و ترکیب الی ۳ و ۴ و بقیه‌ی ژنوتیپ‌ها هموزیگوت و ال ۴ را نشان داد (شکل ۹).

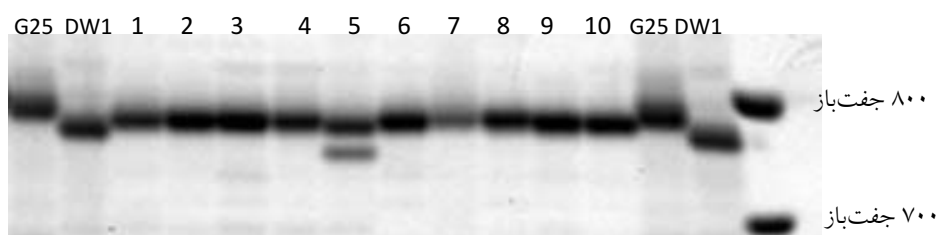
جمعیت Gitit: در این جمعیت ژنوتیپ شماره ۱ سه نوار نشان داد (شکل ۱۰) که سنگین‌ترین نوار به نظر می‌رسد که مربوط به مکان دیگری باشد. با توجه به مشابهت توالی گروه‌های همولوگ و حتی برخی گروه‌های همولوگ وجود بیش از دو نوار در گندم برای نشانگرهای اختصاصی در برخی مطالعات گزارش شده است (۳، ۴، ۱۳). ژنوتیپ ۱ ترکیب الی ۳ و ۴ را نشان می‌دهد. ژنوتیپ‌های شماره ۳، ۸ و ۱۰ هموزیگوت بوده که ژنوتیپ‌های ۳ و ۸ ال ۱ و ژنوتیپ ۱۰ ال ۴ را نشان داد. ژنوتیپ‌های شماره ۲ و ۷ هتروزیگوت و ترکیب الی ۱ و ۳ و ژنوتیپ‌های

جمعیت Amirim: شکل ۷ نشانگر SC792 را در افراد این جمعیت نشان می‌دهد. ژنوتیپ‌های ۱، ۲، ۴، ۸، ۹ و ۱۰ ال یک (ال مقاومت) و ژنوتیپ‌های ۳، ۶ و ۷ ال ۴ را نشان دادند. فرد ۵ تکثیری نداشت ممکن است در ناحیه‌ی این نشانگر در ژنوم این فرد جهشی رخ داده باشد (۳). با توجه به اینکه بقیه‌ی افراد این جمعیت برای این نشانگر تکثیر داشته‌اند احتمال دیگر می‌تواند این باشد که این نمونه از جمعیت‌های دیگر که تکثیری برای این نشانگر نداشتند وارد شده است.

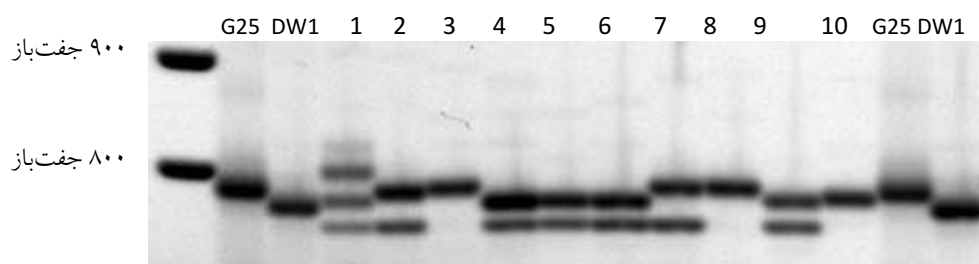
جمعیت Betoren: همه‌ی افراد این جمعیت ال ۵ را دارا بودند و تنوع الی در آن بسیار اندک بود (شکل ۸).

جمعیت Galma: در این جمعیت (شکل ۱۲) ژنوتیپ شماره ۲، دو نوار نشان داد که احتمال دارد نوار بالایی مربوط به مکان دیگری باشد و نوار دیگر ال ۳ می‌باشد (۱۵). بقیه‌ی ژنوتیپ‌های این جمعیت ال یک را نشان دادند. بنابراین همه‌ی ژنوتیپ‌های این جمعیت هموزیگوت و ال ۱ یا ۳ را نشان دادند.

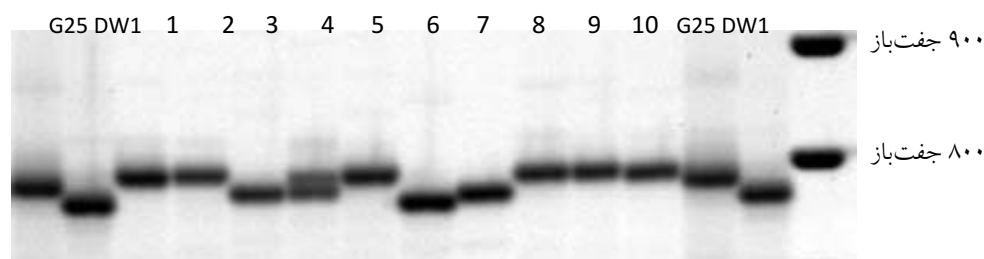
هتروزیگوت ۴، ۵، ۶ و ۹ ترکیب الی ۳ و ۴ را نشان می‌دهند. بنابراین این جمعیت ال‌های ۱، ۳ و ۴ را نشان می‌دهد. جمعیت Jaba: در این جمعیت فقط ژنوتیپ شماره ۴ هتروزیگوت و ترکیب الی ۴ و ۵ را داشت (شکل ۱۱). بقیه ژنوتیپ‌ها هموزیگوت بودند بطوری که ژنوتیپ‌های ۱، ۲، ۵، ۸، ۹ و ۱۰ ال ۵، ژنوتیپ‌های ۳ و ۷ ال ۴ و ژنوتیپ ۶ ال ۲ را نشان داد. بنابراین در این جمعیت ال‌های ۱، ۲، ۴ و ۵ دیده می‌شود.



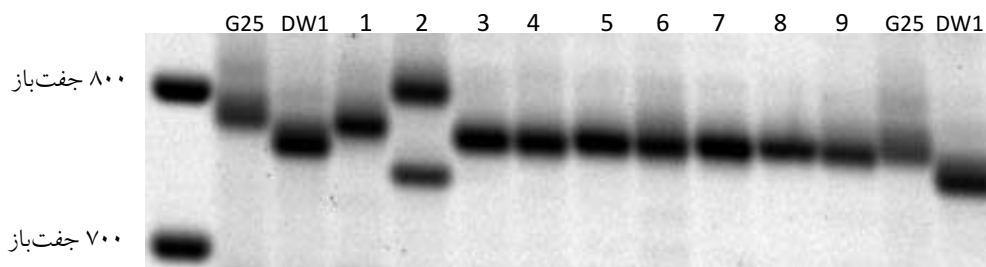
شکل ۹- تصویر ژل مربوط به نشانگر SC792 در جمعیت Givat (لاین G₂₅ و DW1 به ترتیب دارای ژن Yr15 و فاقد آن بوده و ال‌های مقاومت و حساسیت نشانگر SC792 را نشان می‌دهند)



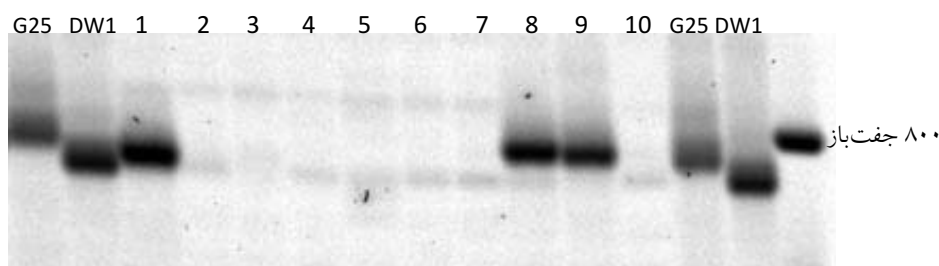
شکل ۱۰- تصویر ژل مربوط به نشانگر SC792 روی جمعیت Gitit (لاین G₂₅ و DW1 به ترتیب دارای ژن Yr15 و فاقد آن بوده و ال‌های مقاومت و حساسیت نشانگر SC792 را نشان می‌دهند)



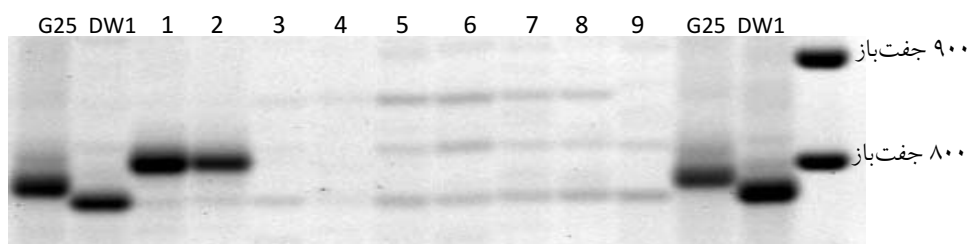
شکل ۱۱- تصویر ژل مربوط به نشانگر SC792 روی جمعیت Jaba (لاین G₂₅ و DW1 به ترتیب دارای ژن Yr15 و فاقد آن بوده و ال‌های مقاومت و حساسیت نشانگر SC792 را نشان می‌دهند)



شکل ۱۲- تصویر ژل مربوط به نشانگر SC792 در جمعیت Galma (لاین G25 و DW1 به ترتیب دارای ژن *Yr15* و فاقد آن بوده و ال‌های مقاومت و حساسیت نشانگر SC792 را نشان می‌دهند)



شکل ۱۳- تصویر ژل مربوط به نشانگر SC792 در جمعیت Turkey (لاین G25 و DW1 به ترتیب دارای ژن *Yr15* و فاقد آن بوده و ال‌های مقاومت و حساسیت نشانگر SC792 را نشان می‌دهند)



شکل ۱۴- تصویر ژل مربوط به نشانگر SC792 در جمعیت Tabigha2 (لاین G25 و DW1 به ترتیب دارای ژن *Yr15* و فاقد آن بوده و ال‌های مقاومت و حساسیت نشانگر SC792 را نشان می‌دهند)

در جمعیت Yehudiyya تکثیری برای نشانگر SC792 مشاهده نشد که احتمالاً حاکی از وقوع جهش در ناحیه ژنومی این نشانگر در مکان اتصال آغازگرها یا ناحیه بین دو آغازگر در این جمعیت می‌باشد (۳، ۱۹).

جمعیت Tabigha2: در این جمعیت (شکل ۱۴) فقط ژنوتیپ‌های ۱ و ۲ دارای فراورده تکثیری برای این نشانگر بودند که با توجه به اختلاف این نوارها نسبت به مکان‌های تکثیر شده در جمعیت‌های مورد بررسی و مشابهت آن با نوارهای خارج از دامنه، به نظر می‌رسد که مربوط به مکان دیگری باشد (۱۵، ۱۹).

جمعیت Turkey: در جمعیت Turkey ژنوتیپ‌های ۱، ۸ و ۹ تکثیر داشتند. ژنوتیپ ۱ ال ۴ و ژنوتیپ‌های ۸ و ۹ ال ۱ یک را نشان دادند. با توجه به اینکه بیشتر افراد جمعیت فراورده‌ای برای این مکان نشان ندادند و این جمعیت به لحاظ فاصله‌ی جغرافیایی از جمعیت‌های دیگر و جمعیت حاوی ژن *Yr15* دورتر بود چنین نتیجه‌ای قابل انتظار بود (این جمعیت از جنوب شرقی ترکیه جمع‌آوری شده بود) احتمال وقوع جهش نیز در این ناحیه در برخی ژنوتیپ‌های این جمعیت منتفی نمی‌باشد (۳، ۱۹).

جدول ۲- تعداد و نوع ال‌های مشاهده شده برای نشانگر SC792 در ۱۶ جمعیت وحشی *T. dicoccoides* مورد مطالعه

جمعیت	نوع ال‌ها	تعداد ال	تعداد ژنوتیپ‌های دارای ژن <i>Yr15</i> (بر اساس وجود نشانگر SC792)
Hermon	۱،۲،۳،۴	۴	۴
Roshpinna	۱،۴	۲	۵
Tabigha1			فاقد فراورده تکثیر
Batshelomo	۱،۲	۲	۵
Gilboa	۱،۳،۴،۵	۴	۱
Gerizim	۱،۲،۳،۴	۴	۱
Kokav	۱،۲،۳،۵	۴	۵
Amirim	۱،۴	۲	۶
Betoren	۵	۱	۰
Givat	۳،۴	۲	۰
Gitit	۱،۳،۴	۳	۴
Jaba	۱،۲،۴،۵	۴	۰
Galma	۱،۳	۲	۸
Turkey	۱،۴	۲	۲
Yehudiyya			فاقد فراورده تکثیر
Tabigha2			(بیشتر افراد فاقد فراورده تکثیر)

بطور کلی ۴۴ فرد دارای ژن *Yr15*، بر اساس نشانگر SC792 در جمعیت‌های مورد مطالعه شناسایی شد. این نشانگر بصورت چنداللی عمل کرده و ۵ نوع ال را برای این مکان در جمعیت‌های وحشی مورد استفاده شناسایی کرد. جدول ۲ تعداد و نوع ال‌ها را برای این جمعیت‌ها نشان می‌دهد.

تمامی ژنوتیپ‌های مورد استفاده در جمعیت‌های Hermon و Roshpinna به لحاظ وجود و عدم وجود ژن *Yr15* مورد آزمون پاتولوژیکی قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های دارای ژن *Yr15* بر اساس آزمون پاتولوژیکی در این دو جمعیت، ال مقاومت نشانگر SC792 را نشان دادند که می‌تواند تاییدی بر نزدیکی و پیوستگی شدید این نشانگر با ژن *Yr15* باشد. علاوه بر این، قدرت تمایز افراد دارای ژن *Yr15* و فاقد آن در این دو جمعیت توسط این نشانگر نشان می‌دهد که نشانگر مذکور در زمینه‌های ژنتیکی

متفاوتی عمل می‌کند. در مطالعات قبلی نیز ارزیابی این نشانگر برای گزینش به کمک نشانگر در ۶۱ رقم و لاین مختلف گندم نشان داده بود که این نشانگر قادر است ژنوتیپ‌های دارای ژن *Yr15* و فاقد آن را با دقت بالایی غربال سازد (۴). بسیاری از نشانگرهای دیگر مانند Xwm413، Xbarc8 و Xwgp34 که در مطالعات قبلی برای گزینش به کمک نشانگر این ژن معرفی شدند (۱۷ و ۲۰) در جمعیت‌های کوچک شناسایی شده بودند و ارزیابی کارایی آنها برای گزینش به کمک نشانگر در زمینه‌های ژنتیکی بسیار محدودی انجام گرفته بود. از طرف دیگر در مکان‌یابی دقیق ژن *Yr15* در یک جمعیت F2 با ۸۲۵ فرد معلوم شد که نشانگر SC792 نسبت به دو نشانگر Xgwm413 و Xbarc8 فاصله ژنتیکی نزدیکی با ژن *Yr15* دارد (۳). در ارزیابی این ۳ نشانگر در

ارقام و لاین‌های گندم با زمینه ژنتیکی مختلف، SC792 موثرترین نشانگر برای گزینش به کمک نشانگر ژن *Yr15* معرفی شد (۴). افرادی که در جمعیت‌های مختلف دیگر در این مطالعه ال‌های مقاومت مشابه ال مقاومت SC792 در ژنوتیپ *G25* را نشان دادند با توجه به تفرق همزمان این نشانگر با ژن *Yr15* به احتمال زیادی دارای این ژن خواهند بود بنابراین می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی گندم برای مقاومت به زنگ زرد استفاده شوند. آزمون پاتولوژیکی روی افراد این جمعیت‌ها در حال انجام می‌باشد تا ال‌های جدید مقاومت و حساسیت با توجه به این نشانگر شناسایی شود. با توجه به اینکه جمعیت‌های *T. dicoccoides* وحشی بوده و ممکن است دارای صفات نامطلوب زیادی باشد بنابراین افراد زیادی از جمعیت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند تا نمونه‌های دارای حداقل صفات نامطلوب برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی انتخاب شوند.

در برخی از نمونه‌ها یا جمعیت‌های مورد بررسی، تکثیری برای این نشانگر مشاهده نشد که احتمالا به دلیل وقوع جهش‌های مختلف در ناحیه‌ی اتصال آغازگر و یا ناحیه‌ی بین دو آغازگر می‌باشد (۳ و ۱۹). در تعداد کمی از ژنوتیپ‌ها سه نوار برای این نشانگر مشاهده شد. در بررسی مکان ژنی *Lr34/yr18* در ژرم پلاسماهای مختلف گندم با استفاده از نشانگر *csLV34* نیز الگوی سه نواری برای برخی ژنوتیپ‌ها مشاهده شد که دلیل آن احتمالا وجود مکان‌های مشابه روی گروه‌های همیولوگ و حتی برخی گروه‌های همولوگ در گندم می‌باشد (۱۳، ۱۵). نکته جالب توجه این است که این نشانگر در جمعیت‌های وحشی که دارای فراورده‌ی تکثیر بود اختصاصی عمل نموده و به ندرت مکان‌های دیگری را برای یک فرد روی کروموزوم‌های همیولوگ و حتی دیگر گروه‌های همولوگ تکثیر کرد. در چندین مورد نشان داده شده که توسعه‌ی نشانگرهای اختصاصی در گندم با توجه به وجود گروه‌های همیولوگ و حتی مکان‌های مشابه روی دیگر گروه‌های همولوگ مشکل می‌باشد. به نظر می‌رسد با توجه به وجود مضاعف شدگی‌های زیاد روی ژنوم B در گندم، این مورد سخت‌تر باشد (۱۳، ۱۹) ولی در این مطالعه نشانگر SC792 بطور اختصاصی عمل نمود و قادر بود افراد هتروزیگوت و هموزیگوت

را از هم متمایز سازد که با توجه به بلاست این نشانگر در بانک‌های اطلاعاتی و عدم وجود توالی‌های تکراری مشابه با این نشانگر، اختصاصی بودن آن مورد انتظار بود. با توجه به اختصاصی بودن این نشانگر و عدم وجود توالی‌های تکراری مشابه آن و تفرق همزمان آن با ژن *Yr15* می‌توان از این نشانگر برای شروع همسانه‌سازی ژن مذکور بر اساس نقشه نیز استفاده کرد.

سپاسگزاری

از موسسه زیست فناوری دانشگاه هلسینکی بخاطر فراهم نمودن مواد گیاهی و کمک‌های مالی برای انجام تحقیق قدردانی می‌شود. از دکتر روسلان کلندر محقق آزمایشگاه ژنومیکس گیاهی موسسه زیست فناوری دانشگاه هلسینکی به خاطر بحث‌های ارزنده در تهیه مقاله سپاسگزاری می‌شود.

منابع

۱. آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۸۴.
۲. قنادها م (۱۳۷۵) استراتژی‌های اصلاحی برای مقاومت به زنگ زرد، مجموعه مقالات کلیدی چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان ۳۸۲-۴۲۶ص.
۳. عبدللهی مندولکانی ب، بی همتا م، زالی ع، یزدی صمدی ب، نقوی م.ر.، شولمن آ (۱۳۸۸) مکان‌یابی دقیق ژن مقاومت به زنگ زرد *Yr15* در گندم دوروم. مجله نهال و بذر. جلد ۲۴، شماره ۳: ۳۷۱-۳۸۷.
۴. عبدللهی مندولکانی ب، بی همتا م، شولمن آ، جعفری م (۱۳۸۸) شناسایی و تایید نشانگرهای شدیداً پیوسته با ژن مقاومت به زنگ زرد *Yr15* در گندم دوروم، مجموعه مقالات ششمین همایش بیوتکنولوژی ایران، سالن همایش های برج میلاد، تهران ۶-۱ ص.

5. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, Albright LM, Coen DM, Varki A (1995) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
6. Chague V, Fahima T, Dahan A, Sun GL, Korol AB, Ronin YL, Grama A, Roder MS, Nevo E (1999) Isolation of microsatellite and RAPD markers flanking the *Yr15* gene of wheat using NILs and bulked segregant analysis. Genome 42: 1050-1056.

7. Chen MX (2005) Epidemiology and control of stripe rust (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*) on wheat. Canadian journal of plant pathology 27: 314–337.
8. Chen XM, Jones SS, Line RF (1996) Chromosomal location of genes for resistance to *Puccinia striiformis* in seven wheat cultivars having resistance genes at *Yr3* and *Yr4* loci. Phytopathology 86: 1228–1233.
9. Chen XM, Line RF (1993) Inheritance of stripe rust resistance in wheat cultivars postulated to have resistance genes at *Yr3* and *Yr4* loci. Phytopathology 83: 382–388.
10. Gerechter-Amitai ZK, Grama A, Van Silfhout CH, Kleitman F (1989b) Resistance to yellow rust in *Triticum dicoccoides*. II. Crosses with resistant *dicoccoides* sel. G₂₅. Netherlands journal of plant pathology 95: 79–83.
11. Gerechter-Amitai ZK, Stubbs RW (1970) A valuable source of yellow rust resistance in Israeli populations of wild emmer, *Triticum dicoccoides* Koren. Euphytica 19: 12–21.
12. Gerechter-Amitai ZK, Van Silfhout CH, Grama A, Kleitman F (1989a) *Yr15*: a new gene for resistance to *Puccinia striiformis* in *Triticum dicoccoides* sel. G₂₅. Euphytica 43: 187–190.
13. Goyal A, Bandopadhyaya R, Sourdille P, Endo TR, Baylan HS, Gupta PK (2005) Physical molecular map of wheat chromosomes. Functional and Integrative Genomics 5: 260–263.
14. Kalendar R, Schulman AH (2006) IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. Nature Protocols 5: 2478–2484.
15. Kolmer JA, Singh RP, Garvin DF, Viccars L, William HM, Huerta-Espino J, Ogbonnaya FC, Raman H, Orford S, Bariana HS and Lagudah ES (2008) Analysis of the *Lr34/Yr18* rust resistance region in wheat germplasm. Crop science 48: 1841–1852.
16. McIntosh RA, Silk J, The TT (1996) Cytogenetic studies in wheat. XVII. Monosomic analysis and linkage relationships of gene *Yr15* for resistance to stripe rust. Euphytica 89: 395–399.
17. Murphy LR, Santra D, Kidwell K, Yan G, Chen X and Campbell KG (2009) Linkage maps of wheat stripe rust resistance genes *Yr5* and *Yr15* for use in marker-assisted selection. Crop science, 49: 1786–1790.
18. Peng JH, Fahima T, Röder MS, Huang QY, Dahan A, Li YC, Grama A, Nevo E (2000) High-density molecular map of chromosome region harboring stripe-rust resistance genes *YrH52* and *Yr15* derived from wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*. Genetica 109: 199–210.
19. Peng JH, Zadeh H, Lazo GR, Gustafson JP, Chao S, Anderson OD, Qi LL, Echalié B, Gill BS, Dilbirligi M, Sandhu D, Gill KS, Greene RA, Sorrells ME, Akhunov ED, Dvorak J, Linkiewicz AM, Dubcovsky J, Hossain KG, Kalavacharla V, Kianian SF, Mahmoud Miftahudin AA, Colney EJ, Anderson JA, Pathan MS, Nguyen HT, McGuire PE, Qualset CO, Lapitan NLV (2004) Chromosome bin map of expressed sequence tags in homologous group 1 of hexaploid wheat and homoeology with rice and Arabidopsis. Genetics 168: 609–623.
20. Peng JH, Fahima T, Röder MS, Li YC, Dahan A, Grama A, Ronin YI, Korol AB, Nevo E (1999) Microsatellite tagging of stripe-rust resistance gene *YrH52* derived from wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, and suggestive negative crossover interference on chromosome 1B. Theoretical and applied genetics 98: 862–872.
21. Singh RP, William HM, Huerta-Espino J, Rosewarne G (2004) Wheat rust in Asia: Meeting the challenges with old and new technologies. Proceeding of the 4th international crop science congress, Brisbane, Australia.
22. Sun GL, Fahima T, Korol AB, Turpeinen T, Grama A, Ronin YL, Nevo E (1997) Identification of molecular markers linked to the *Yr15* stripe rust resistance gene of wheat originated in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*. Theoretical and applied genetics 95:622–628.

