



شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با مقاومت به بیماری پاخوره گندم نان (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) جدایه T-41

حسین دشتی^۱، خدیجه میرزامحمدعلی دردری^۲، خلیل ملک‌زاده^۳، روح‌الله صابری ریسه^۴ و مژگان قلی‌زاده وزوانی^۵

۱- استاد گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان (نویسنده مسوول: dashti@vru.ac.ir)
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان
۳- استادیار گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان
۴- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان
۵- دانشجوی دکترا بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۵
صفحه: ۴۹ تا ۵۸

چکیده

بیماری پاخوره گندم یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم در مناطق مرطوب می‌باشد و موجب خسارت قابل توجه در این مناطق می‌شود و هنوز رقم مقاومی نسبت به این بیماری شناسایی نشده است؛ لذا پژوهش در جهت شناسایی ژن‌های مقاومت به این بیماری و تولید ارقام مقاوم و یا ارقام با حساسیت کمتر در گندم نان از اهمیت زیادی برخوردار است. در این پژوهش، به منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با مقاومت به یک جدایه از قارچ عامل بیماری پاخوره (T-41)، از جمعیت F₂ حاصل از تلاقی ژنوتیپ‌های حساس (۱۵۴۶ و ۱۶۴) و مقاوم (۱۵۲۸) و تجزیه تفرق توده‌ای استفاده شد. پس از کاشت جمعیت F₂ والدین در گلخانه و آلودگی مصنوعی گیاهان به قارچ عامل بیماری، فنوتیپ گیاهان با توجه به میزان آلودگی از طریق نمره‌دهی تعیین گردید و پس از استخراج DNA والدین و افراد F₂، براساس نمره بیماری دو بالک از DNA افراد مقاوم و حساس تهیه گردید که همراه با DNA والدین توسط آغازگرهای RAPD، SCoT، ISSR و SSR مورد تجزیه (PCR) قرار گرفتند. از آغازگرهای مورد استفاده تنها یک آغازگر ISSR در والد و بالک مقاوم تولید باندی در محدوده ۴۰۰ جفت باز نمود که در والد و بالک حساس وجود نداشت. سپس کلیه افراد بالک‌ها و F₂ برای این نشانگر تعیین ژنوتیپ گردیدند و تجزیه رگرسیون و تجزیه کای‌مربع ارتباط معنی‌دار بین نشانگر مذکور و نمره بیماری را نشان داد. رگرسیون نمره بیماری روی باند ۴۰۰ (b = -۰/۷۰۹^{*}) بیانگر وجود این باند در نمره‌های پایین (افراد مقاوم) است. همچنین توزیع افراد F₂ در تلاقی ۱۵۲۸ × ۱۵۴۶ بر اساس نمره بیماری وجود رابطه اپیستازی (۹: حساس، ۶: نیمه‌حساس، ۱: مقاوم) را تایید نمود که نشان داد احتمالاً حساسیت به این بیماری توسط ژن‌های غالب کنترل می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تجزیه تفرق توده‌ای، چندشکلی، پاخوره گندم، اپیستازی، نشانگر.

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی می‌باشد که حدود ۲۰٪ (۲۲۰ میلیون هکتار) از کل اراضی دنیا به آن اختصاص یافته و ماده غذایی اصلی حدود ۳۵٪ مردم جهان را تشکیل می‌دهد (۲۶). در ایران گندم منبع اصلی کالری و پروتئین مورد نیاز جمعیت کشور است.

به طوری که ۷۵٪ پروتئین و ۶۵٪ کالری دریافتی هر فرد را تشکیل می‌دهد (۲۶). بیماری‌های مختلفی به گندم خسارت وارد می‌کنند و عملکرد و کیفیت دانه گندم را تحت تاثیر قرار می‌دهند. پوسیدگی‌های ریشه و طوقه گندم از جمله بیماری‌های مهمی هستند که هر ساله به گندم خسارت وارد می‌کنند. از جمله عوامل اصلی این بیماری‌ها، قارچ‌های خاکزی متعلق به جنس‌های *Fusarium*، *Rhizoctonia* و *Gaeumannomyces* هستند (۲۸).

پاخوره گندم با عامل قارچی *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* از عوامل مهم پوسیدگی ریشه در تیره گندمیان محسوب می‌شود. این بیماری در سراسر جهان که گندم تحت آب و هوای معتدل کشت می‌گردد، هم‌چنین در مناطق استوایی در ارتفاعات بالا شدت دارد (۲۲). علائم پاخوره بیشتر هنگام تشکیل سنبله و شیری شدن دانه‌ها بروز می‌کند. با گسترش بیماری میسلیموم تار عنکبوتی قارچ عامل

بیماری در سطوح ریشه و پایه ساقه ظاهر می‌شود و بتدریج بافت‌های طوقه و پایه ساقه به‌رنگ تیره در می‌آیند (۲۷). کنترل بیماری پاخوره در مناطق آلوده با استفاده از روش‌های زراعی و مدیریتی انجام می‌شود. روش‌های زراعی و مدیریتی متعددی از قبیل آیش، تناوب با گیاهان غیرمیزبان، کاشت دیر هنگام، استفاده از کودهای نیتروژن به فرم آمونیوم، کاشت در خاک‌های اسیدی، کاشت در بستر نسبتاً فشرده، تا حدودی بیماری پاخوره گندم را کاهش می‌دهد (۲).

یکی از روش‌های مهم جهت کنترل بیماری پاخوره گندم شناسایی و استفاده از واریته‌های مقاوم است (۱۷). به تازگی از *Thinopyrum intermedium* که مقاوم به پاخوره است، ژن *R2-R3-MYB* را کلون نموده‌اند. این ژن را به گندم انتقال داده و براساس ارزیابی‌های صورت گرفته مشاهده شد که گندم تراریخته *TiMYB2R-1* سطح بالایی از مقاومت به پاخوره را دارد (۱۶). علی‌رغم اظهارات در منابع که هنوز هیچ رقم مقاوم به بیماری پاخوره شناسایی و معرفی نشده است، در پژوهشی جمعیتی از ژنوتیپ‌های گندم نان (۹۶۰ ژنوتیپ گندم نان) در مقابل بیماری پاخوره (جدایه T-41) غربال شدند، تعدادی ژنوتیپ مقاوم به این نژاد از بین این ۹۶۰ ژنوتیپ انتخاب شد (۹، ۱۰، ۱۱) احتمالاً این ژنوتیپ‌های مقاوم فقط در مقابل این جدایه و یا نژاد خاص از بیماری پاخوره مقاومت نشان داده‌اند. در ارزیابی گلخانه‌ای

پاخوره و شناسایی ژن‌های مقاوم با این بیماری در ژرم‌پلاسم گندم نان تاکنون به‌طور جامع انجام نشده است. نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد که ژن‌های مقاوم به بیماری پاخوره بیشتر در اجداد و خویشاوندان وحشی گندم (گونه‌های آگروپرون و آجیلوپس) وجود دارند (۱۷،۱۵،۵،۸،۱۲) و گفته شده است که مقاومت این گونه‌ها به بیماری پاخوره ممکن است پلی‌ژنی باشد (۱۳). *Haynaldia villosa* سطح بالایی از مقاومت به پاخوره را دارد. TH3 یک آمفی‌پلوئید بین گندم دوروم و *Haynaldia villosa* می‌باشد. در یک مطالعه هیبرید بین گندم و TH3 و مشتقات این تلاقی را با به‌کار بردن ۱۵۰ آغازگر RAPD، مورد تجزیه مولکولی قرار دادند که فقط یک آغازگر (آغازگر S1230) توانست با تکثیر باند ۱۵۴۰ بین مشتقات مقاوم و حساس تفاوت ایجاد نماید (۱۴). اساس ژنتیکی مقاومت به بیماری پاخوره در گندم نان مشخص نیست و تا به حال ژن‌هایی در ارتباط با مقاومت به این بیماری در داخل گندم نان شناسایی نشده است اما تنوع ژنتیکی از نظر واکنش به این بیماری در ژرم‌پلاسم گندم نان گزارش شده (۱۵،۱۴،۱۳،۱۷). بنابراین این پژوهش به‌منظور شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با مقاومت به بیماری پاخوره (جدایه T-41) با استفاده از نسل تفرق F₂ انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، دو ژنوتیپ حساس (۱۵۴۶ و ۱۶۴) و یک ژنوتیپ مقاوم (۱۵۲۸) به بیماری پاخوره (جدایه T-41) از کلکسیون ژرم‌پلاسم دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان تهیه و تلاقی‌های زیر به‌منظور تولید جمعیت در حال تفرق F₂ انجام شد (جدول ۱). ژنوتیپ‌های والدینی از بین ۹۶۰ نمونه گندم نان که از مناطق مختلف ایران و همچنین خارج کشور جمع‌آوری شده بودند انتخاب شدند. این ۹۶۰ نمونه گندم نان در سال زراعی ۱۳۹۴-۱۳۹۳ در مزرعه دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان کشت و از هر نمونه یک تک خوشه انتخاب و تکثیر شده و در گلخانه نسبت به بیماری پاخوره (جدایه T-41) ارزیابی شده و به‌عنوان لاین خالص در بانک ژن دانشگاه نگهداری می‌شوند (۱۰،۱۱،۹).

تلاقی‌های حاصل از ارقام مقاوم و حساس که از طریق تجزیه میانگین نسل انجام شد، مشخص شد که اثرات غالبیت و اپیستازی شدید در کنترل مقاومت به این بیماری دخیل هستند و احتمال داده شد که در واکنش گندم نان به جدایه T-41 از این بیماری، دو ژن با اثر اپیستازی ۱:۹:۶:۱ دخالت دارند (۳).

در انتخاب به‌کمک نشانگر (MAS)^۱ ژن مورد نظر بر اساس پیوستگی که با یک نشانگر ژنتیکی دارد تشخیص داده شده و انتخاب می‌شود. بنابراین به‌عنوان اولین قدم در روش انتخاب به‌کمک نشانگر باید نشانگرهای پیوسته با ژن‌های مورد نظر شناسایی شوند و ژن‌های کنترل‌کننده صفت مورد نظر را نشانمند نمود (۱۸). روش تجزیه تفرق توده‌ای (BSA)^۳.

به‌عنوان یک روش سریع برای شناسایی نشانگرها در مناطق خاص ژنوم با استفاده از جمعیت‌های در حال تفرق است (۱۸). برای شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن مقاومت به بیماری ریزومانیا در چندرقند از جمعیت F₂ و ۲۱۵ آغازگر RAPD استفاده شد، نتایج نشان داد که سه آغازگر در دو توده مقاوم و حساس چندشکلی ایجاد نمودند (۶). همچنین در پژوهش دیگری با به‌کاربردن ۳۴۱ آغازگر ریزماهواره، فقط ۱۶ آغازگر توانست علاوه بر والدین، بین دو توده نیز چندشکلی نشان دهند (۱۹). در آزمایشی که روی بیماری ورتیسلیوم در گیاه پنبه، در نسل‌های در حال تفرق انجام شد، مشخص شد که از ۳۰۰ آغازگر RAPD مورد استفاده تنها یک آغازگر باندی حدود ۸۰۰ جفت باز را در والد و بالک حساس آشکار ساخت که در والد و بالک مقاوم وجود نداشت (۲۵). BSA نه تنها در شناسایی نشانگر پیوسته با صفات کیفی استفاده می‌شود، بلکه در شناسایی نشانگرهایی که با صفات کمی پیوستگی دارند، نیز استفاده شده است. برای مثال در پژوهشی که روی صفت طول غلاف در جمعیت دابل هاپلوئید کلزا (*Brassica napus*) با آغازگر RAPD با روش تجزیه تفرق توده‌ای انجام گرفت (۲۳). در نهایت یک نقشه لینکازی نشانگر مولکولی حاوی ۳۷ مکان ژنی RAPD برای این جمعیت جهت تشخیص مکان‌های ژنی صفت کمی (QTL) کنترل‌کننده صفت طول غلاف شناسایی شد (۲۳). مطالعات ژنتیکی در مورد اساس ژنتیکی مقاومت به بیماری

جدول ۱- ژنوتیپ‌های انتخاب شده بعنوان والدین و تلاقی‌های انجام شده

Table 1. Selected genotypes as parents and accomplished crosses.

شماره تلاقی	تلاقی	ویژگی والد اول (P ₁)	ویژگی والد دوم (P ₂)
۱	(P ₁) ۱۵۲۸ × (P ₂) ۱۶۴	مقاوم به بیماری پاخوره، پاییزه	حساس به پاخوره، بهاره
۲	(P ₁) ۱۵۴۶ × (P ₂) ۱۵۲۸	حساس به پاخوره، پاییزه	مقاوم به پاخوره، پاییزه

تلقیح استفاده شد. به‌منظور تهیه‌ی مایه تلقیح بذر ارزن پخته شده که حداکثر جذب آب را داشته‌باشد به‌همراه ۱۰۰ گرم ماسه مرطوب درون ارلن ریخته و پس از مسدود کردن درب آن به فاصله یک روز، دوبار در اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه سترون شد. چند حلقه میسلیومی با قطر یک سانتی‌متر از حاشیه در حال رشد پرگنه قارچ عامل بیماری به هر یک از ارلن‌ها مایه‌زنی و در انکوباتور در دمای

قارچ مورد استفاده و تهیه مایع تلقیح

در این پژوهش از قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* جدایه T-41 که از کلکسیون قارچ‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان تهیه شده بود، استفاده شد. جهت تهیه زادمایه بیمارگر، چون سرعت کلنیزاسیون و پروپاگول‌های قارچ مذکور روی ماده غذایی ارزن بیشتر است، از ارزن به‌عنوان تهیه مایه

۲- ریشه دارای لکه‌های ممتد نکروزه (نکروزه شدن بیشتر از ۲۵٪ و کمتر از ۵۰٪ ریشه‌ها) و طوقه بدون علائم (تقریباً مقاوم).

۳- نکروزه شدن بیشتر از ۵۰٪ ریشه‌ها و سیاه‌شدگی طوقه (مقاومت متوسط).

۴- ریشه‌ها تقریباً سیاه رنگ با توسعه ۷۵٪ سیاه‌شدگی طوقه (حساس).

۵- سیاه شدن ریشه و طوقه و سبز خشکیدگی گیاه (خیلی حساس) (۲۱).

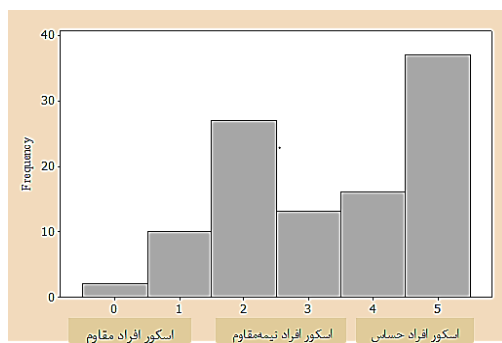
از تمام بوته‌های کشت‌شده نمونه برگی برداشت و جهت استخراج DNA به ازت مایع و فریزر ۸۰- منتقل شدند و استخراج DNA در آزمایشگاه به روش CTAB با کمی تغییر (۴) انجام گرفت. سنجش کیفی و کمی DNA استخراج شده با ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانودراپ انجام شد. شکل ۱ توزیع افراد F₂ از نظر نمره بیماری را برای تلاقی ۱۵۲۸ × ۱۵۴۶ نشان می‌دهد. بالک حساس (ترکیب DNA ۱۰ فرد حساس) و بالک مقاوم (ترکیب DNA ۱۰ فرد مقاوم) ایجاد شد.

۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ روز نگهداری شدند. در دوره اخیر چندین بار ازلن‌ها جهت هوادهی و جلوگیری از گلوله شدن، تکان داده شدند (۱۷).

کاشت مواد ژنتیکی در گلخانه و اندازه‌گیری نمره بیماری

آزمایش در گلخانه دانشگاه ولی‌عصر(عج) در سال ۱۳۹۶ انجام شد. والدین مقاوم و حساس هر تلاقی در چهار گلدان (۸۰۰ گرمی به نسبت ۲ به ۱ خاک مزرعه به ماسه) و در هر گلدان ۴ بوته و بذور F₂ هر تلاقی در ۳۴ گلدان و در هر گلدان ۴ بوته کشت شدند. ۱۰ روز بعد از کشت، عملیات تلقیح روی گیاهچه‌ها انجام گرفت. از هر گلدان ۳ گیاهچه انتخاب گردید و ۲ گرم از مایه تلقیح دقیقاً در کنار طوقه قرار داده شد و سطح آن کاملاً با ماسه پوشانده شد. ۶ هفته پس از تلقیح، درصد سیاه‌شدگی طوقه بررسی گردید. بر اساس درصد نکروزه شدن ریشه‌ها و طوقه‌ها نمره بیماری بین ۵-۰ به شرح زیر تعیین شد:

- ۰- ریشه‌ها و طوقه‌ها بدون لکه نکروزه (کاملاً مقاوم).
- ۱- ریشه دارای یک یا چند لکه نکروزه و طوقه فاقد علائم (مقاوم).



شکل ۱- توزیع افراد F₂ بر اساس اسکور (نمره) بیماری در تلاقی ۱۵۲۸ × ۱۵۴۶
Figure 1. Distribution of F₂ population based on disease scores in 1528 × 1546 crosses

اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه با واسرشت‌سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه (دمای اتصال آغازگرهای SSR در جدول ۳ آورده شده است) و بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C بود. همچنین چرخه‌های حرارتی برای آغازگر RAPD شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و به دنبال آن ۴۴ چرخه با واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر به مدت ۱ دقیقه (دمای اتصال آغازگرهای RAPD در جدول ۴ آورده شده است) و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. چرخه‌های حرارتی برای آغازگر SCoT شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ چرخه با واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (دمای اتصال آغازگرهای SCoT در جدول ۵ آورده شده است) و

به منظور انجام تجزیه تفرق توده‌ای برای بیماری پاخوره، DNA بالک‌های مقاوم و حساس با استفاده از آغازگرهای SSR، SCoT و RAPD مورد PCR قرار گرفتند. تکثیر DNA در حجم ۱۰ میکرولیتر مخلوط واکنش حاوی مسترمیکس با غلظت 2x، به میزان ۵ میکرولیتر، آغازگر رفت و برگشت (آغازگر SSR) از هر کدام به میزان ۰/۲۵ میکرولیتر با غلظت نهایی ۱۰ پیکومول بر مول، DNA الگو با غلظت ۳۰ نانوگرم بر میکرولیتر به میزان ۱/۵ میکرولیتر و در نهایت ۳ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه بود. برای آغازگرهای SCoT، RAPD و ISSR میزان ۰/۵ میکرولیتر از آغازگر مورد استفاده قرار گرفت. چرخه‌های حرارتی برای آغازگر ISSR شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۴۰ چرخه با واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه (دمای اتصال آغازگرهای ISSR در جدول ۲ آورده شده است) و بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲°C بود. چرخه‌های حرارتی برای آغازگر SSR شامل یک چرخه واسرشت‌سازی

SSR از ژل آغاز ۲/۵ درصد و برای سایر آغازگرها، از ژل آغاز ۱/۵ درصد و سائز مارکر ۵۰ جفت باز و ۱۰۰ جفت باز استفاده شد.

بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. برای مشاهده قطعات تکثیر شده برای آغازگر

جدول ۲- آغازگرهای ISSR مورد استفاده

Table 2. The ISSR markers used in this study

آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال	آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال
۱	5'-ACACACACACACACACAC-3	۵۰	۱۱	5'-CACACACACACACACAT-3	۵۰
۲	5'-CACACACACACACAAG-3	۵۰	۱۲	5'-GAGAGAGAGAGAGATT-3	۵۰
۳	5'-GAGAGAGAGAGAGAYC-3	۵۱	۱۳	5'-CTCTCTCTCTCTCTG-3	۵۰
۴	5'-GAGAGAGAGAGAGAYC-3	۵۰	۱۴	5'-CTCTCTCTCTCTCTAC-3	۴۴
۵	5'-AGAGAGAGAGAGAGYT-3	۵۱	۱۵	5'-ATATATATATATATATRG-3	۳۵
۶	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTYC-3	۵۰	۱۶	5'-CTCTCTCTCTCTCTCTYA-3	۴۴
۷	5'-CACACACACACACACARC-3	۵۰	۱۷	5'-ATATATATATATATATYC-3	۳۵
۸	5'-AGAGAGAGAGAGAGGG-3	۵۰	۱۸	5'-TCTCTCTCTCTCTCAG-3	۴۴
۹	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT-3	۵۰	۱۹	5'-ATATATATATATATATYT-3	۳۵
۱۰	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAA-3	۵۰	۲۰	5'-ATATATATATATATATGC-3	۳۵

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای SSR مورد استفاده

Table 3. The SSR primers used in this study

ردیف	آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال
۱	Xbare3	F: 5'-TTCCTGTGCTTTCTAATTTTTTTT-3' R: 5'-GCGAACTCCCGAACATTTTTAT-3'	۵۵
۲	barc0124	F: 5'-TGCACCCCTCCAATCT-3' R: 5'-TGCAGTCGTGGTGTG-3'	۵۵
۳	Xbare144	F: 5'-GCGTTTTAGGTGGACGACATAGATAGA-3' R: 5'-GCGCCACGGGCATTTCTCATAC-3'	۵۵
۴	Xbare56	F: 5'-GCGGGAATTTACGGGAAGTCAAGAA-3' R: 5'-GCGAGTGGTTCAAATTTATGTCIGT-3'	۶۰
۵	Gpw95001	F: 5'-TTCCTCTCCCTCCAACCTT-3' R: 5'-GTGCTTTGTGGATGCTTATGATCTCCC-3'	۵۰
۶	Gpw95024	F: 5'-AATTCAGTCCACACGCCC-3' R: 5'-GTGCTTAGCAGACATCAGAGCGGG-3'	۶۰
۷	Xbare232	F: 5'-CGCATCCAACCATCCCAACCAACA-3' R: 5'-CGCAGTAGATCCACCCCGCAGA-3'	۶۵
۸	Xbare233	F: 5'-GCGTCCTAGTTCTCAAATGCCCCGTCA-3' R: 5'-CGCTTCCCTCCGCCCTCCAC-3'	۶۰
۹	Xbare246	F: 5'-GCGTAATGTCCCTTCTCTGTT-3' R: 5'-GCGATATTTAGGCTTGTGCGACTTGAG-3'	۵۰
۱۰	Xbare244	F: 5'-GCGAAGAATTAATAACAAGGTACATGATA-3' R: 5'-CCGTCTCAAATTTACACCGCTATATG-3'	۵۲
۱۱	Xbare253	F: 5'-GGGAAGACACGACGACTC-3' R: 5'-TCGTAAGATTACCTCGGATGAAGAA-3'	۵۰
۱۲	Xbare249	F: 5'-GCGTGTGTAAGATCGGACCAAGAGAG-3' R: 5'-GTGGCAGAATATTGATCAGTAGTT-3'	۵۰
۱۳	WMC179	F: 5'-CATGGTGGCCATGAGTGGAGGT-3' R: 5'-CATGATCTTGCCTGTGCGTAGG-3'	۶۷
۱۴	WMS108	F: 5'-ATTAATACCTGAGGGAGGTGC-3' R: 5'-GGTCTCAGGAGCAAGAACAC-3'	۶۲
۱۵	WMS198	F: 5'-TTGAACCGGAAGGAGTACAG-3' R: 5'-TCAGTTTATTTGGGCATGTG-3'	۵۸
۱۶	WMC445	F: 5'-AGAATAGGTTCTTGCCAGTC-3' R: 5'-GAGATGATCTCCTCCATCAGCA-3'	۶۴
۱۷	WMS118	F: 5'-GATGGTGCCACTTGAGCATG-3' R: 5'-GATTGTCAAATGGAACACCC-3'	۵۸
۱۸	WMS149	F: 5'-CATTGTTTCTGCCTCTAGCC-3' R: 5'-CTAGCATCGAACCTGAACAAG-3'	۶۹
۱۹	WMC307	F: 5'-GTTTGAAGACCAAGCTCCTCT-3' R: 5'-ACCATAACCTCTCAAGAACCA-3'	۶۰
۲۰	WMC322	F: 5'-CGCCCCACTATGCTTTG-3' R: 5'-CCCAGTCCAGTAGCCTCC-3'	۵۷

جدول ۴- مشخصات آغازگرهای RAPD مورد استفاده

Table 4. The RAPD primers used in this study

ردیف	آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال	ردیف	آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال
۱	OP G-20-915	5'-TCTCCCTCAG-3'	۳۵/۵	۲۱	UBC-101-915	5'-GCGGCTGGAG-3'	۳۸
۲	OPH-08-915	5'-GAAACACCCC-3'	۳۸	۲۲	UBC-243-915	5'-GGGTGAAGCC-3'	۳۸
۳	OPI-15-915	5'-TCATCCGAGG-3'	۳۸	۲۳	UBC-239-915	5'-CTGAAGCGGA-3'	۳۸
۴	OPP-12-915	5'-AAGGGCGAGT-3'	۳۸	۲۴	OP M-06-915	5'-CTGGGCAACT-3'	۳۸
۵	OPL-05-915	5'-ACGCAGGCAC-3'	۳۸	۲۵	UBC-790-915	5'-GGGTGTGGTT-3'	۳۸
۶	UBC-336-915	5'-GCCACGGAGA-3'	۳۸	۲۶	OP O-14-915	5'-AGCATGGCTC-3'	۳۸
۷	UBC-465-915	5'-GGTCAGGGCT-3'	۳۵/۵	۲۷	OP N-05-915	5'-ACTGAACGCC-3'	۳۸
۸	UBC-337-915	5'-TCCCGAACCG-3'	۳۵/۵	۲۸	UBC-396-915	5'-GAATGCGAGG-3'	۳۷/۱
۹	UBC-301-915	5'-CGGTGGCGAA-3'	۳۸	۲۹	UBC-639-915	5'-ATCGAGCACC-3'	۳۶/۵
۱۰	UBC-292-915	5'-AAACAGCCCG-3'	۳۵/۵	۳۰	UBC-365-915	5'-TAGACAGAGG-3'	۳۵/۵
۱۱	UBC-244-915	5'-CAGCCAACCG-3'	۳۸	۳۱	UBC-348-915	5'-CACGGTGCC-3'	۳۵/۵
۱۲	UBC-127-915	5'-ATCTGGCAGC-3'	۳۸	۳۲	UBC-601-915	5'-CCGCCACTG-3'	۳۸
۱۳	UBC-291-915	5'-AGCTGAAGAG-3'	۳۸	۳۳	UBC-542-915	5'-CCCATGGCCC-3'	۳۵/۶
۱۴	UBC-073-915	5'-GGGCACGCGA-3'	۳۵/۵	۳۴	UBC-403-915	5'-GGAAGGCTGT-3'	۳۸
۱۵	UBC-775-915	5'-GGTTTGGTGG-3'	۳۸	۳۵	UBC-247-915	5'-TACCGACGGA-3'	۳۶
۱۶	UBC-569-915	5'-CGAATTGCTG-3'	۳۵/۵	۳۶	UBC-248-915	5'-GAGTAAGCGG-3'	۳۸
۱۷	UBC-574-915	5'-GCCAGACAAG-3'	۳۷/۵	۳۷	UBC-731-915	5'-CCCACACCAC-3'	۳۸
۱۸	UBC-586-915	5'-ATGGATGACG-3'	۳۸	۳۸	UBC-556-915	5'-ATGGATGACG-3'	۳۸
۱۹	UBC-499-915	5'-GGCCGATGAT-3'	۳۸	۳۹	UBC-574-915	5'-GCCAGACAAG-3'	۳۸
۲۰	UBC-417-915	5'-GACAGGCCAA-3'	۳۵/۵	۴۰	UBC-290-915	5'-CCGCAGCAC-3'	۳۸

جدول ۵- مشخصات آغازگرهای SCoT مورد استفاده

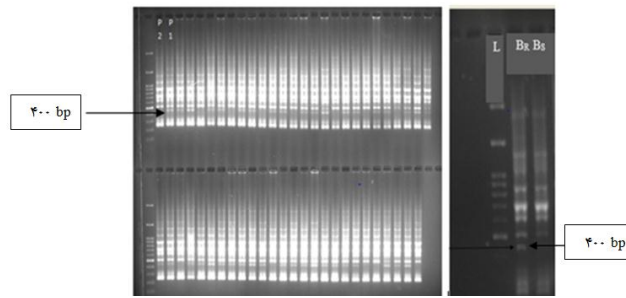
Table 5. The SCoT primers used in this study

آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال	آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال
۱	5'-CAACAATGGCTACCACCA-3'	۵۲	۱۸	5'-CAACAATGGCTACCACGC-3'	۵۴
۲	5'-CAACAATGGCTACCACCC-3'	۵۴	۱۹	5'-CAACAATGGCTACCACGG-3'	۵۴
۳	5'-CAACAATGGCTACCACCG-3'	۵۴	۲۰	5'-CAACAATGGCTACCACGT-3'	۵۲
۴	5'-CAACAATGGCTACCACCT-3'	۵۲	۲۱	5'-CAACAATGGCTACCAGCA-3'	۵۲
۵	5'-CAACAATGGCTACCACGA-3'	۵۲	۲۲	5'-CAACAATGGCTACCAGCC-3'	۵۲
۶	5'-AAGCAATGGCTACCACCA-3'	۵۴	۲۳	5'-CACCATGGCTACCACCAG-3'	۵۲
۷	5'-ACGACATGGCGACCAACG-3'	۵۴	۲۴	5'-CACCATGGCTACCACCAT-3'	۵۴
۸	5'-ACGACATGGCGACCATCG-3'	۵۴	۲۵	5'-ACCATGGCTACCACCGGG-3'	۵۴
۹	5'-ACGACATGGCGACCACGC-3'	۵۴	۲۶	5'-ACCATGGCTACCACCGTC-3'	۵۴
۱۰	5'-ACGACATGGCGACC CGGA-3'	۵۴	۲۷	5'-ACCATGGCTACCACCGTG-3'	۵۴
۱۱	5'-ACCATGGCTACCACCGAC-3'	۵۴	۲۸	5'-CCATGGCTACCACCGCA-3'	۵۴
۱۲	5'-ACCATGGCTACCACCGAG-3'	۵۴	۲۹	5'-CCATGGCTACCACCGCC-3'	۵۴
۱۳	5'-ACCATGGCTACCACCGCC-3'	۵۴	۳۰	5'-CCATGGCTACCACCGCG-3'	۵۴
۱۴	5'-ACCATGGCTACCACCGGC-3'	۵۴	۳۱	5'-CCATGGCTACCACCGCCT-3'	۵۴
۱۵	5'-ACCATGGCTACCACCGCG-3'	۵۴	۳۲	5'-CCATGGCTACCACCGCAC-3'	۵۴
۱۶	5'-ACGACATGGCGACCCACA-3'	۵۴	۳۳	5'-CCATGGCTACCACCGCAG-3'	۵۴
۱۷	5'-AACCATGGCTACCACCAC-3'	۵۴			

نتایج و بحث

از ۲۰ آغازگر ISSR بررسی شده، در تلاقی 1528×164 یک آغازگر با توالی 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYT-3' توانست بین بالک‌های مقاوم و حساس با تکثیر قطعه ۴۰۰bp، چندشکلی ایجاد نماید، که این باند در والد و بالک مقاوم وجود داشت. افراد هر بالک و ۱۳۶ فرد F_2 نیز با این نشانگر بررسی شدند و بین افراد نیز تفاوت معنی‌دار دیده شد (شکل ۲). در بررسی‌های انجام شده روی بیماری زنگ در گندم، با به کار بردن ۲۳۰ آغازگر ریزماهوره، تنها یک آغازگر توانست بین والد و بالک مقاوم تفاوت ایجاد کند (۱). در پژوهش انجام

شده برای شناسایی نشانگرهای ریزماهوره پیوسته با ژن‌های مقاومت به بلایت فوزاریومی سنبله در گندم انجام شد که والدین و دو توده (بالک) مقاوم و حساس از گیاهان F_2 (شامل ۱۵ گیاه در هر توده) توسط ۳۴۱ آغازگر ریزماهوره غربال شدند. ۱۲۵ آغازگر بین والدین چند شکلی نشان دادند که بین آن‌ها ۱۶ نشانگر علاوه بر والدین، بین دو توده نیز چند شکل بودند. این ۱۶ نشانگر برای تعیین ژنوتیپ افراد دو توده (۳۰ فرد) استفاده شدند، اما تنها ۸ آغازگر چند شکلی معنی‌داری نشان دادند (۱۹).



شکل ۲- الگوی چندشکلی نشانگر ISSR-5 در افراد جمعیت F₂ تلاقی ۱۵۲۸×۱۶۴، P₁ (والد مقاوم)، P₂ (والد حساس)، B_R (بالک مقاوم) و B_S (بالک حساس)، L: نشانگر وزنی ۱۰۰ bp
 Figure 2. Polymorphism pattern of the ISSR-5 primer in F₂ populations of 1528 × 164, P₁ (resistant parent), P₂ (susceptible) size marker (100 bp)

رگرسیون مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۷). این باند بیشتر در افراد دارای اسکوره‌های پایین (صفر و ۱ و ۲) مشاهده شد و دارای ضریب رگرسیون ساده 0.709^* بود. با توجه به اینکه اسکوره‌های بیماری توزیع پیوسته نداشتند، رابطه بین باند و صفت از طریق کای مربع نیز بررسی شد (جدول ۸).

بررسی رابطه بین نشانگر ISSR و نمره‌دهی بیماری از طریق تجزیه تک مارکری
 باند ۴۰۰ جفت باز در بعضی از افراد دارای اسکوره‌های ۳، ۴ و ۵ هم مشاهده شد، لذا لینکاژ بین این باند و مقاومت به بیماری به صورت شدید (Tight Linkage) مشاهده نشد. بنابراین رابطه بین این نشانگر و بیماری از طریق تجزیه

جدول ۶- نتایج تجزیه رگرسیون باند ۴۰۰ جفت باز حاصل از آغازگر ISSR-5 روی اسکور بیماری

Prob	میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییر
0.03	۱۵/۳۳	۱	رگرسیون
	۳/۱۸	۱۳۴	خطای رگرسیونی
		۱۳۵	کل
Score = ۲/۵۶۵ - ۰/۷۰۹۷ (۴۰۰) bp			معادله رگرسیونی

جدول ۷- آزمون کای مربع برای نشان دادن رابطه بین اسکور بیماری و باند ۴۰۰ جفت باز حاصل از آغازگر ISSR

نسبت مورد انتظار	نمره بیماری			صفات
۳:۱	۰ و ۱	۲ و ۳	۴ و ۵	
۴۳	۱۵	۱۰	۱۸	وجود و عدم وجود باند
	$\chi^2 = 0.414$	$\chi^2 = 1.590$	$\chi^2 = 5.487$	
۹۳	۴۱	۳۷	۱۵	
	$\chi^2 = 0.191$	$\chi^2 = 0.735$	$\chi^2 = 2.537$	
	$\chi^2 = 3.17^{ns}$	$\chi^2 = 10.95^{**}$	df = ۲	

مورد آزمایش قرار گرفت، که چندشکلی مشاهده شد، اما ارتباط آن با نمره بیماری ثابت نشد (شکل ۴). نشانگرهای SSR بر اساس نواحی تکراری ژنوم گیاه طراحی می‌شوند و چون با توجه به اینکه ۸۰ درصد ژنوم گندم دارای توالی تکراری می‌باشد، می‌تواند به عنوان نشانگر مفید برای تفکیک افراد مقاوم و حساس به بیماری مد نظر قرار بگیرد. همانطور که در پژوهش‌های دیگران روی بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم، رابزومانی در چغندر قند با نشانگر SSR انجام و پلی‌مورفیسم بین افراد دیده شد، اما لینکاژ معنی‌داری بین باند پلی‌مورف و مقاومت به بیماری مشاهده نشد (۲۰، ۱۹). در تحقیقی به منظور ارزیابی مقاومت نسبی توتون نسبت به بیماری Y سیب‌زمینی با استفاده از ۱۰۰

نتایج حاصل از بررسی مولکولی و تجزیه رگرسیون برای نشانگر SSR

در این مطالعه از ۲۲ آغازگر SSR استفاده شد که فقط ۳ آغازگر در بالک‌های مقاوم و حساس تفاوت نشان دادند. آغازگر 95001gpw در بالک تلاقی ۱۵۴۶×۱۵۲۸ و آغازگر SSR-6 در بالک و والد تلاقی ۱۵۴۶×۱۵۲۸ تفاوت نشان دادند (نتایج نشان داده نشده). آغازگر SSR-6 در بالک مقاوم باندی نشان داد که در بالک حساس وجود نداشت. این نشانگر در افراد جمعیت F₂ این تلاقی نیز به کار برده شدند. اما با بیماری لینکاژ نشان ندادند. آغازگر 95001 gpw در بالک و والد حساس باندی در محدوده ۲۰۰ bp تکثیر نمود که در بالک و والد مقاوم وجود نداشت، این نشانگر در افراد F₂ هم

والد مقاوم ژنوتیپ BB و به والد حساس ژنوتیپ AA نسبت داده شد، شمارش ژنوتیپ‌های در حال تفرق برابر بود با ۲۶BB: ۶۰AB: ۱۹AA که با نسبت ساده مندلی ۱:۲:۱ کاملاً مطابقت داشت ($\chi^2 = ۲/۶۶^{ns}$). همچنین وجود یک باند حدود ۵۵۰ جفت باز مشاهده شد که افراد هتروزیگوت دارای این باند بودند و نتایج همبستگی به روش اسپیرمن هم بیانگر این بود که باند ۵۵۰ جفت باز همبستگی زیادی به وجود دو باند (۲۰۰ و ۲۵۰ جفت باز) دارد (جدول ۹ و شکل ۴). اگرچه در این پژوهش به علت محدود بودن آغازگرهای SSR نشانگری از نوع SSR مرتبط با بیماری پاخوره پیدا نشد؛ اما چنانچه تعداد بیشتری از این آغازگرها برای این منظور استفاده شود کارایی بیشتری از ISSRها دارند.

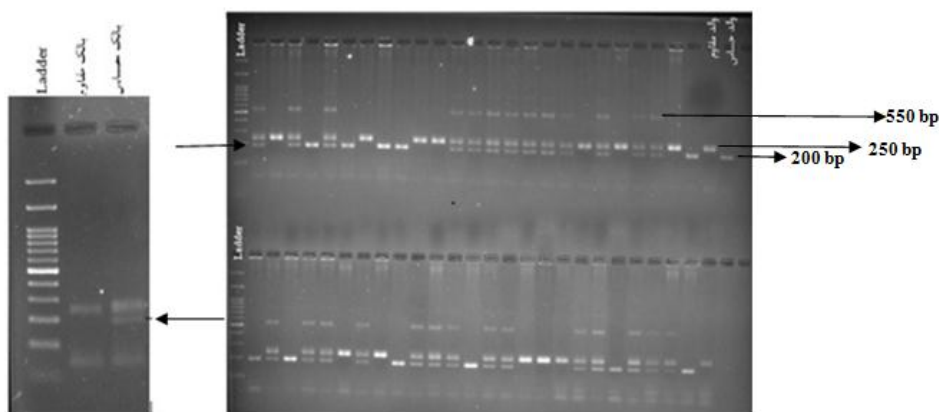
آغازگر SSR انجام شد. نتایج نشان داد که از بین این آغازگرها، ۲۸ جفت آغازگر توانستند الگوی نواری متقارنی در بین والدین مقاوم و حساس به بیماری نشان دهند. آزمایشات بر روی بالک مقاوم و حساس نشان داد که سه آغازگر دارای بیشترین ارتباط با مقاومت به بیماری هستند که به عنوان نشانگر پیوسته به ژن مقاومت به بیماری PVY معرفی شدند (۲۴). همچنین در بررسی‌های انجام شده روی بیماری زنگ در گندم، با به کار بردن ۲۳۰ آغازگر ریزماهواره، تنها یک آغازگر توانست بین والد مقاوم و بالک مقاوم تفاوت ایجاد کند (۱).

نشانگر SSR، قادر به تمایز افراد هتروزیگوت و هموزیگوت می‌باشد؛ به عبارتی دارای توارث هم بارز است. در بررسی مولکولی با نشانگر gpw 95001 در این پژوهش، به

جدول ۸- نتایج همبستگی اسپیرمن بین جایگاه‌های تکثیر و اسکور بیماری در نشانگر ریزماهواره gpw

Table 8. Results of Spearman correlation between the amplified locus and disease score in SSR marker of gpw

باند/اسکور	اسکور بیماری	۲۰۰ جفت باز	۲۵۰ جفت باز	۵۵۰ جفت باز
اسکور بیماری	۱			
۲۰۰ جفت باز	۰/۰۳۳ ^{ns}	۱		
۲۵۰ جفت باز	-۰/۰۶۶ ^{ns}	-۰/۲۷۰ ^{**}	۱	
۵۵۰ جفت باز	-۰/۱۰۳ ^{ns}	۰/۵۲۶ ^{***}	۰/۴۳۱ ^{***}	۱

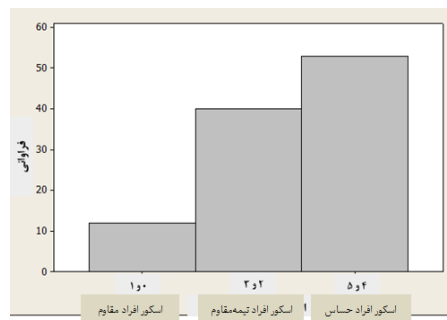


شکل ۳- الگوی چندشکلی نشانگر ریزماهواره gpw95001 در افراد جمعیت F₂، بالک‌ها و والدین مقاوم و حساس در تلاقی ۱۵۲۸×۱۵۴۶
Figure 3. Pattern of polymorphic microsatellite markers (gpw95001) in F₂ population, bulks, resistant and susceptible parents of 1546 × 1528 crossing

کلاس‌های فنوتیپی بادغام نمره‌های ۰ و ۱ با هم به عنوان فنوتیپ مقاوم، ۲ و ۳ به عنوان فنوتیپ نیمه مقاوم و ۴ و ۵ با هم به عنوان حساس توانستیم وجود رابطه اپیستازی (ژن‌های مضاعف با اثرات افزایشی) را اثبات کنیم. لذا احتمالاً عکس‌العمل گندم نسبت به بیماری پاخوره توسط دو ژن کنترل می‌شود (شکل ۵، جدول ۹).

بررسی رابطه اپیستازی در مقاومت به بیماری پاخوره بر اساس نمره بیماری

با توجه به توزیع افراد F₂ و مشاهده فراوانی بیشتر افراد در کلاس‌های حساس، بیانگر غالبیت در جهت حساسیت است (شکل ۱). از آنجایی که عملاً تفکیک بین نمره‌های ۲ و ۳ و بین نمره‌های ۴ و ۵ کاملاً قاطع نمی‌باشد. لذا برای تفسیر و توجیه ژنتیکی بهتر



شکل ۴- ادغام اسکور بیماری در افراد F₂ تلاقی ۱۵۲۸×۱۵۴۶
Figure 4. merge of disease score in F₂ population of 1546 × 1528 cross

جدول ۹- آزمون کای مربع برای مطابقت نسبت‌های فنوتیپی مشاهده شده با فرضیه ۹:۶:۱ برای تلاقی ۱۵۲۸×۱۵۴۶
Table 9. Chi-square test for phenotypic ratios consistent with the hypothesis of 9: 6: 1 for 1528 × 1546 cross

کلاس فنوتیپی	تعداد مشاهده شده (Oi)	نسبت‌های مورد انتظار	تعداد مورد انتظار (Ei)	$\chi^2 = \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$
۰ و ۱ (aabb)	۱۳	۱	۶/۵۶	۶/۳۲
۲ و ۳ (A-bb) و (aaB-)	۴۰	۶	۳۹/۳۷	۰/۰۱
۴ و ۵ (A-B-)	۵۲	۹	۵۹/۰۶	۰/۸۴
	۱۰۵	۱۶	۱۰۵	$\chi^2 = 7/19^{ns}$

نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR، می‌توان ژن‌های مقاومت را شناسایی و کلون نمود و گامی مهم در جهت پیشرفت مطالعات مولکولی برداشت. از آنجایی که ژنوم گندم جز بزرگترین ژنوم گونه‌های گیاهان زراعی است و ۸۰ درصد ژنوم گندم را توالی تکراری تشکیل داده است، با توجه به نتایج این پژوهش و نتایجی که قبلاً توسط محققان متعدد روی این بیماری انجام گرفته، می‌توان احتمال داد که مقاومت به این بیماری چندژنی باشد. پژوهش‌های تکمیلی در رابطه با بررسی ژنتیکی مقاومت به این بیماری و پیدا نمودن نشانگرهایی که لینکاژ شدید با مقاومت به این بیماری در سطح ژنوم داشته باشد، نیاز به تهیه نقشه لینکاژی و تجزیه QTL دارد.

تنوع ژنتیکی افراد در ژرم پلاسما گندم نان و شناسایی ژن‌های مقاومت به بیماری پاخوره می‌تواند کارایی تولید ارقام جدید را در برنامه‌های اصلاحی گندم نان را بهبود بخشد. تاکنون ژن مقاومت به بیماری پاخوره در گندم نان شناسایی نشده است. از بین نشانگرهای مولکولی استفاده شده در این پژوهش، آغازگرهای RAPD و SCOT و SSR نتوانستند چندشکلی مرتبط با مقاومت یا حساسیت به بیماری پاخوره را در درون افراد جمعیت در حال تفرق نشان دهند که یکی از دلایل مهم می‌تواند کمی بودن تعداد این آغازگرها باشد. در این پژوهش، یکی از آغازگرهای ISSR توانست الگوی چندشکلی مرتبط با مقاومت به بیماری را در درون افراد در حال تفرق نشان دهد و تقریباً افراد مقاوم و حساس بر اساس نمره بیماری را از یکدیگر تفکیک نماید. با کمک

منابع

1. Akfirat, F., Y. Aydin, F. Ertugrul, S. Hasancebi, H. Budak, K. Akan, and A. Uncuoglu. 2010. A microsatellite marker for yellow rust resistance in wheat. *Cereal Research Communications*, 38(2): 203-210.
2. Asher, M.J.C. and P.J. Shipton. 1981. *Biology and control of take-all*. Academic Press New York, 219.
3. Dashti, H., Z. Shahabadini Parizi, R. Saberi Rish, M.R. Bihamta and M. Gholizadeh Vazvani. 2018. Genetical analysis of resistance to Take-all (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) T-41 isolation in bread wheat using generation mean analysis. *Journal of Crop Breeding*, (Accepted) (In Persian).
4. Doyle, J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, 19: 11-15.
5. Eastwood R.F. and J.F.M. Kollmorgen Hannah. 1993. *Triticum tauschii*: reaction to the take-all fungus (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*). *Australian Journal of Agricultural Research*, 44: 745-154.
6. Faghahi, S.A., P. Noroozi, A. Saidi and K. Zargari. 2009. Identification of continuous molecular markers of rhizomania resistance gene in sugar beet using mass fragmentation analysis. *Green Knowledge of Iran*, 4: 7-1 (In Persian).

7. Firat, F., Y. Aydin, F. Ertugrul, S. Hasancebi, H. Budak, K. Akan and A. Uncuoglu. 2010. A microsatellite marker for yellow rust resistance in wheat. *Cereal Research Communications*, 38(2): 203-210.
8. Foex, E. 1935. Quelques observations sur les maladies du pied des ckrkales. *Seances Academic Agriculcturee of Frrance*, 21: 501-505.
9. Gholizadeh Vazvani, M., H. Dashti, R. Saberi Riseh and M.R. Bihamta. 2016. Study of relationship between of vegetative traits and resistance to take-all disease in greenhouse condition. *Iranian Journal of Plant Protection*, 47(1): 11-21 (In Persian).
10. Gholizadeh Vazvani, M., H. Dashti, R. Saberi Riseh and M.R. Bihamta. 2017. Screening Bread Wheat germplasm for resistance to take-all disease (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) in greenhouse conditions. *Journal of agriculture science and Technology*, 19: 1173-1184.
11. Gholizadeh Vazvani, M., H. Dashti, R. Saberi Riseh and M.R. Bihamta. 2015. Comparison between spring and autumn growth types of different wheat (*Triticum aestivum*) genotypes in response to Take-all disease. *Iranian Journal of Plant Protection*, 46(2): 307-316 (In Persian).
12. Halloran G.M. 1974. *Ophiobolus gmminis* resistance in the general *Agropyron* and *Secale* and its possible significance to wheat breeding. *Euphytica*, 23: 225-235.
13. Hui, H.D., L.Z. Shan, C. Xia, Z.Zeng-yan, C.C. Ceng, S.H. He and X.Y. Yong. 2007. Molecular Characterization of a *Triticum durum-Haynaldia villosa* Amphiploid and its derivatives for resistance to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Agriculture Science in China*, 6(5): 513-521.
14. Kim, Y.K., B. Friebe and W.W. Bockus. 2003. Resistance to take-all is not expressed in wheat-alien Chromosome addition and subsitiuiones. *Plant Health Progress*, 11-24.
15. Linde-Laursein, J., P. Ensenh and H. Jorgensejn. 1973. Resistance of *Triticale*, *Aegilops*, and *Haynaldia* species to the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis*. *Z. Pflanzenzuecht*, 70: 200-213.
16. Liu, X., L.X. Yang, M. Zhou, Y. Zhou, L. Lu, H. Ma and Z. Zhang. 2013. Transgenic wheat expressing *Thinopyrum intermedium* MYB transcription factor *TiMYB2R-1* shows enhanced resistance to the take-all disease. *Journal of Experimental Botany*, 8: 2243-2253.
17. McMillan, V.E. 2012. Identification and characterization of resistance to the take-all fungus in wheat. Ph.D. Thesis. Biological Sciences England, University of Exter.
18. Michelmores, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked sergeant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 88: 9828-9832.
19. Najafi, A., S.A. Mohammadi, M. Toorchi, K.J. Chalmers, M. Moghadam, M. Torabi and S. Aharizad. 2009. Identification of SSR Markers Linked to Fusarium Head Blight Resistance Genes in Wheat. *Journal of Agricultural Science*, 19(2): 84-71 (In Persian).
20. Noahi, A. 2005. Tagging of resistance gene to Rhizomania disease in Sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Master's thesis, Faculty of Agricultural Sciences, Zanjan (In Persian).
21. Ownley, B.H., B.K. Duffy and D.M. Weller. 2003. Identification and manipulation of soil properties to improve the biological control performance of phenazine-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6): 3333-3343.
22. Sadravi, M. 2008. Important Diseases of Crops. Publications SID, Mashhad (In Persian).
23. Samizadeh, H., B. Yazdi-Samadi, M.R. Ghannadha, M.A. Malbobi, A.R. Taleei and. Rice Stringam. 2003. A Study of Molecular Marker Associated with Pod Length Trait in Canola (*B. napus*) Doubled Haploid Population. *Iranian Journal of Agricultural Science*, 34(4): 879-871 (In Persian).
24. Shazde Ahmadi, M. and M.R. Salavati Mibodi. 2016. Evaluation of Relative Resistance of *Tobacco* to *Potato Virus Y* Using Microsatellite Markers (SSR), 14(2): 97-10 (In Persian).
25. Taheripoorfard, Z.S. 2003. Identification of Molecular Marlier Linked to *Verticillium* Resita Joe Gene using bulk sergeant analysis (BSA) in cotton. Master's thesis, Faculty of Agricultural Sciences, Gilan (In Persian).
26. Vahabzadeh, M. and S. Mahfoozi. 2011. Irrigated winter and facultative wheat research and production in Iran. Abstract Book, 1st Regional Winter Wheat Symposium, 25-27 June, Tabriz, Iran, 42-43.
27. Weste, G. and L. Thrower. 1963. Production of perithecia and microconidia in culture by *Ophiobolus graminis*. *Phytopathology*, 53: 534-542.
28. Wiese, M.V. 1987. Compendium of wheat disease. (2nd ed). APS Press.

Detection of Molecular Markers Linked To Bread Wheat Take-All Disease (*Gaeumannomyces Graminis* Var. *Tritici*) T-41 Isolation

Hossein Dashti¹, Khadijeh Mirzamohammad Ali Dardari², Khalil Malekzadeh³,
Ruhollah Saberi Risseh⁴ and Mojgan Gholizadeh Vazvani

1- Professor, Department of Genetics and Plant Production, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran (Corresponding author: dashti@vru.ac.ir)

2- M.Sc. Student in Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan

3- Assistant Professor, Department of Genetics and Plant Production, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan

4- Associate Professor, Department of Medical Plant, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran.

5- PhD Student of Plant Pathology, Department of Plant Medicine, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan

Received: January 23, 2019

Accepted: June 26, 2019

Abstract

Take-all is one of the most important diseases of wheat in wet areas, causing significant damage in these areas, and there has not introduced any resistant varieties against this disease until now. Therefore, efforts to identify the resistance genes to this disease and developing resistant varieties or cultivars with lower susceptible in bread wheat have a great importance. In this research, in order to identify the markers related to resistance to a isolate of take-all (T-41), a population of F₂ derived from crosses of susceptible genotypes (1546 and 164) with resistant genotype (1528) and bulk segregate analysis (BSA) where used. After planting the F₂ population and parents in the greenhouse and artificial infection the plants with the fungus, the plant phenotype was determined according to the amount of contamination by scoring. After DNA extraction of parents and F₂ population, two bulk of DNA was prepared from resistant and susceptible individuals based on disease scores. The bulks and parental DNAs where analyzed by RAPD, SCoT, ISSR and SSR primers and PCR reaction. Among the primers are used, only one ISSR primer produced a band of 400 bp in the resistant parent and bulk which was not found in the susceptible parent and bulk. Then, all individuals of bulks and F₂ where genotyped for this marker and regression and chi-square analysis showed a significant relationship between this marker and the disease score. The regression of disease score on band 400bp ($b = -0.709$) indicates that this band is more abundant in low scores (resistant individuals). Also, the distribution of F₂ individuals in one of the crosses confirmed the existence of the epistatic (9sensitive: 6 semi sensitive: 1resistance) relationship.

Keywords: Bulk Segregate Analysis (BSA), Polymorphism, Wheat Take-All, Epistatic, Marker