



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، روح الله صابری ریسه^۴ و مژگان قلیزاده وزوانی^۵

۱- استاد گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان (نويسنده مسؤول: dashti@vru.ac.ir)

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح باتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان

۳- استادیار گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

۴- دانشیار گروه گیاه‌پردازی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

۵- دانشجوی دکترا بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پردازی، 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 فارج عامل بیماری پاخوره (T-41)، از جمعیت F_2 حاصل از تلاقی ژنوتیپ‌های حساس (۱۵۴۶ و ۱۶۴) و مقاوم (۱۵۲۸) و تجزیه تفرق توده‌ای استفاده شد. پس از کاشت جمعیت F_2 والدین در گلخانه و آسودگی مصنوعی گیاهان به قارچ عامل بیماری، فنوتیپ گیاهان با توجه به میزان آسودگی از طریق نمره‌دهی تعیین گردید و پس از استخراج DNA والدین و افراد F_2 ، براساس نمره بیماری دو بالک از افراد مقاوم و حساس تعیین گردید که همراه با DNA والدین توسط آغازگرهای 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 ۴۰۰-۴۷۰ جفت باز نمود که در والد و بالک حساس وجود نداشت. سپس کلیه افراد بالکها و F_2 برای این نشانگر تعیین ژنوتیپ گردیدند و تجزیه رگرسیون و تجزیه کای مربع ارتباط معنی‌دار بین نشانگر مذکور و نمره بیماری را نشان داد. رگرسیون نمره بیماری روی باند $400 = -0.709^{**}$ (b) بیانگر وجود این باند در نمره‌های پایین (افراد مقاوم) است. همچنین توزیع افراد F_2 در تلاقی 1528×1546 بر اساس نمره بیماری وجود رابطه ایستازی (۶: حساس، ۶: نیمه حساس، 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، ایستازی، نشانگر.

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی می‌باشد که حدود 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 طوفه گندم از جمله بیماری‌های مهمی هستند که هر ساله به گندم خسارت وارد می‌کنند. از جمله عوامل اصلی این بیماری‌ها، فارج‌های خاکزی متعلق به جنس‌های *Fusarium*, *Rhizoctoni* و *Gaeumannomyces* هستند (۲۸).

پاخوره گندم با عامل قارچی *Gaeumannomyces* var. *graminis* از عوامل مهم پوسیدگی ریشه در تبره 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 می‌سیلیوم 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 متعددی از قبیل آیش، تناوب با گیاهان غیرمیزبان، کاشت دیرهنگام، 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 تراویرخته *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 (ان) در مقابل بیماری پاخوره (جدایه T-41) غربال شدند، تعدادی ژنوتیپ مقاوم به این نژاد از بین این ۹۶۰ ژنوتیپ انتخاب شد (۹۱۰، 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 به طور جامع انجام نشده است. نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد که ژن‌های مقاومت به بیماری پاخوره بیشتر در اجداد و خویشاوندان وحشی گندم (گونه‌های آگروپیرون و آجلیپس) وجود دارند (۱۷،۱۵،۵،۸،۱۲) و گفته شده است که مقاومت این گونه‌ها به بیماری پاخوره ممکن است پلی‌ژنی باشد (۱۳). سطح بالایی از مقاومت به پاخوره را دارد. TH3 یک آمفی‌پلوئید بین گندم دوروم و *Haynaldia villosa* می‌باشد. در یک مطالعه هیربرید بین گندم و TH3 و مشتقات این تلاقی را با به کار 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 ژن‌های 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 (۱۷،۱۳،۱۴،۱۵). بنابراین این پژوهش به منظور 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 (۱۶۴ و ۱۵۴۶) و یک ژنوتیپ مقاوم (۱۵۲۸) به بیماری پاخوره (جدایه T-41) از کلکسیون ژرمپلاسم دانشگاه ولی عصر(عج) رفسنجان تهیه و تلاقی‌های زیر به منظور تولید جمعیت در حال تفرق F₂ انجام شد (جدول ۱). ژنوتیپ‌های والدینی از بین ۹۶۰ نمونه گندم نان که از مناطق مختلف ایران و همچین خارج کشور جمع‌آوری شده بودند انتخاب شدند. این ۹۶۰ نمونه گندم نان در سال زراعی ۱۳۹۳-۱۳۹۴ در مزرعه دانشگاه ولی عصر رفسنجان کشت و از هر نمونه یک تک خوش انتخاب و تکثیر شده و در گلخانه نسبت به بیماری پاخوره (جدایه T-41) ارزیابی شده و به عنوان لاین خالص در بانک ژن دانشگاه نگهداری می‌شوند (۱۱۹، ۱۰).

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 ۹:۶ دخالت دارند (۳).

در انتخاب به کمک نشانگر (MAS)^۱ ژن مورد نظر بر اساس پیوستگی که با یک نشانگر ژنتیکی دارد تشخیص داده شده و انتخاب می‌شود. بنابراین به عنوان اولین قدم در روش انتخاب به کمک نشانگر باید نشانگرهای پیوسته با ژن‌های مورد نظر شناسایی شوند و ژن‌های کنترل کننده صفت مورد نظر را نشانمند^۲ نمود (۱۸). روش تجزیه تفرق توده‌ای (BSA)^۳.

به عنوان 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 ریزوومانیا در چوندرقند از جمعیت F₂ و 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 به کار بردن ۳۴۱ آغازگر ریزو ماوهاره، فقط ۱۶ آغازگر توانست علاوه بر والدین، بین دو توده نیز چندشکلی نشان دهد (۱۹). در آزمایشی که روی بیماری ورتیسیلیوم 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). 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 هاپلوبیوتیک لکزا (*Brassica napus*) با آغازگر RAPD 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) کنترل کننده صفت طول غلاف شناسایی شد (۲۳). مطالعات ژنتیکی در مورد اساس ژنتیکی مقاومت به بیماری

جدول ۱- ژنوتیپ‌های انتخاب شده به عنوان والدین و تلاقی‌های انجام شده

Table 1. Selected genotypes as parents and accomplished crosses.

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

تلقیح استفاده شد. به منظور تهیه مایه تلقیح بذر ارزن پخته شده که حدکثر جذب آب را داشته باشد به همراه 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 سانتی گراد به مدت 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 ولی عصر (عج) رفسنجان تهیه شده بود، استفاده شد. جهت تهیه زادمایه بیمارگر، چون سرعت کلینیزاسیون و پروپاگولهای قارچ مذکور روی ماده غذایی ارزن بیشتر است، از ارزن به عنوان تهیه مایه

۲- ریشه دارای لکه های ممتد نکروزه (نکروزه شدن بیشتر از ۰.۲۵٪ و کمتر از ۰.۵۰٪ ریشه ها) و طوقه بدون علایم (تقریباً مقاوم).

۳- نکروزه شدن بیشتر از ۰.۵۰٪ ریشه ها و سیاه شدگی طوقه (مقاومت متوسط).

۴- ریشه ها تقریباً سیاه رنگ با توسعه ۷۵٪ سیاه شدگی طوقه (حساس).

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

از تمام بوته های کشت شده 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 آکارز یک درصد و دستگاه نانودرایپ انجام شد. شکل ۱ توزیع افراد F_2 از نظر نمره بیماری را برای تلاقي $\times 1528 \times 1546$ نشان می دهد. بالک حساس (تکیب DNA ۱۰ فرد حساس) و بالک مقاوم (تکیب DNA ۱۰ فرد مقاوم) ایجاد شد.

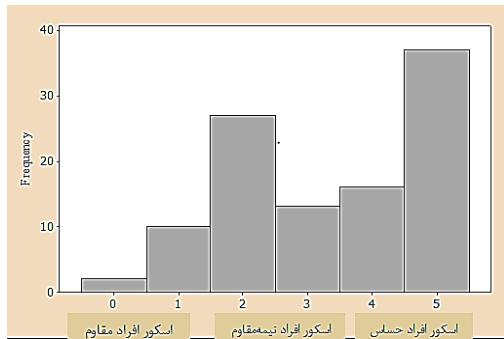
۲۰-۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ روز نگهداری شدند. در دوره اخیر چندین بار ارلن ها جهت هواده هی و جلوگیری از گلوله شدن، تکان داده شدند (۱۷).

کاشت مواد ژنتیکی در گلخانه و اندازه گیری نمره بیماری

آزمایش در گلخانه دانشگاه ولی عصر(عج) در سال ۱۳۹۶ انجام شد. والدین مقاوم و حساس هر تلاقی در چهار گلدان (۸۰۰ گرمی به نسبت ۲ به ۱ خاک مزروعه به ماسه) و در هر گلدان ۴ بوته و بذور F_2 هر تلاقی در گلدان ۴ گلدان و در هر گلدان ۴ بوته کشت شدند. ۱۰ روز بعد از کشت، عملیات تلقیح روی گیاهچه ها 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 سیاه شدگی طوقه برسی گردید. بر اساس درصد نکروزه شدن ریشه ها و طوقه ها نمره بیماری بین ۰-۵ شرح زیر تبیین شد:

- ریشه ها و طوقه ها بدون لکه نکروزه (کاملاً مقاوم).

- ریشه دارای یک یا چند لکه نکروزه و طوقه فاقد علایم (مقاوم).



شکل ۱- توزیع افراد F_2 بر اساس اسکور (نمره) بیماری در تلاقي $\times 1528 \times 1546$
Figure 1. Distribution of F_2 population based on disease scores in 1528×1546 crosses

اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه با واسرشت سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه (دمای اتصال آغازگر های SSR جدول ۳ آورده شده است) و بسط در دمای ۷۳°C به مدت ۴۰ ثانیه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C بود. همچنین چرخه های حرارتی برای آغازگر RAPD شامل یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه و به دنبال آن ۴۴ چرخه با واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر به مدت ۱ دقیقه (دمای اتصال آغازگر های RAPD در جدول ۴ آورده شده است) و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود. چرخه های حرارتی برای آغازگر SCoT شامل یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۴۰ چرخه با واسرشت درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه (demais اتصال آغازگر ISSR در جدول ۲ آورده شده است) به مدت ۷۲°C به مدت ۳ دقیقه و نهایتاً یک چرخه 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. چرخه های حرارتی برای آغازگر SSR شامل یک چرخه واسرشت سازی

به منظور انجام تجزیه تفرق توده ای برای بیماری پاخوره، بالک های مقاوم و حساس با استفاده از آغازگر های SSR، SCoT و PCR مورد قرار گرفتند. تکثیر DNA در حجم ۱۰ میکرولیتر مخلوط واکنش حاوی مستر میکس با غلظت ۲x، 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، الگو DNA با غلظت ۳۰ نانو گرم بر میکرولیتر به میزان ۱/۵ میکرولیتر و در نهایت ۳ میکرولیتر آب قطره دیونیزه بود. برای آغازگر های SCoT و RAPD به میزان ۵/۰ میکرولیتر از آغازگر ISSR شامل یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۴۰ چرخه با واسرشت درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه (demais اتصال آغازگر ISSR در جدول ۲ آورده شده است) به مدت ۷۲°C به مدت ۳ دقیقه و نهایتاً یک چرخه 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. چرخه های حرارتی برای آغازگر SSR شامل یک چرخه واسرشت سازی

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

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

جدول ۲- آغازگرهای ISSR مورد استفاده

Table 2. The ISSR markers used in this study

دماي اتصال	تولاي آغازگر	آغازگر	دماي اتصال	تولاي آغازگر	آغازگر
۵۰	۵'-CACACACACACACAT-3'	۱۱	۵۰	۵'-ACACACACACACACACYG-3'	۱
۵۰	۵'-GAGAGAGAGAGAGAGATT-3'	۱۲	۵۰	۵'-CACACACACACACAAG-3'	۲
۵۰	۵'-CTCTCTCTCTCTCTG-3'	۱۳	۵۱	۵'-GAGAGAGAGAGAGAYC-3'	۳
۴۴	۵'-CTCTCTCTCTCTCTAC-3'	۱۴	۵۰	۵'-GAGAGAGAGAGAGAYC-3'	۴
۴۵	۵'-ATATATATATATATATRG-3'	۱۵	۵۱	۵'-AGAGAGAGAGAGAGYT-3'	۵
۴۴	۵'-CTCTCTCTCTCTCTYA-3'	۱۶	۵۰	۵'-GTGTGTGTGTGTGTYC-3'	۶
۴۵	۵'-ATATATATATATATATYC-3'	۱۷	۵۰	۵'-CACACACACACACACARC-3'	۷
۴۴	۵'-TCTCTCTCTCTCTCAG-3'	۱۸	۵۰	۵'-AGAGAGAGAGAGAGAGGG-3'	۸
۴۵	۵'-ATATATATATATATATYT-3'	۱۹	۵۰	۵'-AGAGAGAGAGAGAGAGT-3'	۹
۴۵	۵'-ATATATATATATATATGC-3'	۲۰	۵۰	۵'-GAGAGAGAGAGAGAGAA-3'	۱۰

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای SSR مورد استفاده

Table 3. The SSR primers used in this study

دماي اتصال	تولاي آغازگر	آغازگر	رديف
۵۵	F: ۵'-TTCCCTGTGTCTTCTAATTTTTTT-3' R: ۵'-GCGAACCTCCGAACATTTTAT-3'	Xbarc3	۱
۵۵	F: ۵'-TGCACCCCTTCCAATCT-3' R: ۵'-TGCAGTCGTGTTGT-3'	barc0124	۲
۵۵	F: ۵'-GCGTTTAGGTGGACGACATAGATAGA-3' R: ۵'-GCCAACGGGCATTCTCATAC-3'	Xbarc144	۳
۶۰	F: ۵'-GCGGAATTACGGGAAGTCAGAA-3' R: ۵'-GCGAGTGGTCAAATTATGCTGT-3'	Xbarc56	۴
۵۰	F: ۵'-TTCTTCTCCCTCCAACCTT-3' R: ۵'-GTGTCTTGTTGATGCTATGATCTCC-3'	Gpw95001	۵
۶۰	F: ۵'-AATTCACTCACACGCC-3' R: ۵'-GTGTCTTAGCAGACATCAGAGCGGG-3'	Gpw95024	۶
۶۵	F: ۵'-CGCATCCAACCATCCCCACCAACA-3' R: ۵'-CGCAGTAGATCCACCAACCCGCCAGA-3'	Xbarc232	۷
۶۰	F: ۵'-GCGTCTAGTTCTCAAATTGCCCCGTCA-3' R: ۵'-CGCTTCTCTCGCCCTTCCAC-3'	Xbarc233	۸
۵۰	F: ۵'-GCGTAATGTCCCCTCTCTGGT-3' R: ۵'-GCGATATTCTAGGCTTGTGCGACTTGAG-3'	Xbarc246	۹
۵۲	F: ۵'-GCGAAGAATTAACAAAGGTACATGATA-3' R: ۵'-CCGCTCAAATTACCGCTATATG-3'	Xbarc244	۱۰
۵۰	F: ۵'-GGGAAGACACGACACGACTC-3' R: ۵'-TCGTAAGATTACCTCGATGAAGAA-3'	Xbarc253	۱۱
۵۰	F: ۵'-GCGTGTGTAAGATCGGGACCAAGAGAG-3' R: ۵'-GTGGCAGAAATTGATCAGTAGTT-3'	Xbarc249	۱۲
۶۷	F: ۵'-CATGGTGGCCATGAGTGGAGGT-3' R: ۵'-CATGATCTGGTGTGCGTAGG-3'	WMC179	۱۳
۶۲	F: ۵'-ATTAATACCTGAGGGAGGTG-3' R: ۵'-GGTCTCAGGAGCAAGAACAC-3'	WMS108	۱۴
۵۸	F: ۵'-TTGAACCGGAAGGGAGTACAG-3' R: ۵'-TCAGTTTATTGGCATGTG-3'	WMS198	۱۵
۶۴	F: ۵'-AGAATAGGTTCTGGGCCAGTC-3' R: ۵'-GAGATGATCTCTCATCAGCA-3'	WMC445	۱۶
۵۸	F: ۵'-GATGGTGCCTTGTGAGCAT-3' R: ۵'-GATTGTCAAATGAAACACCC-3'	WMS118	۱۷
۶۹	F: ۵'-CATTGTTCTGCTCTAGCC-3' R: ۵'-CTAGCATGAAACCTGAACAAAG-3'	WMS149	۱۸
۶۰	F: ۵'-GTTTGAAGACCAAGCTCTCCT-3' R: ۵'-ACCATAACCTCTAAGAACCCA-3'	WMC307	۱۹
۵۷	F: ۵'-CGCCCCACTATGCTTG-3' R: ۵'-CCCAAGTCCAGTAGCCTCC-3'	WMC322	۲۰

جدول ۴- مشخصات آغازگرهای RAPD مورد استفاده

Table 4. The RAPD primers used in this study

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

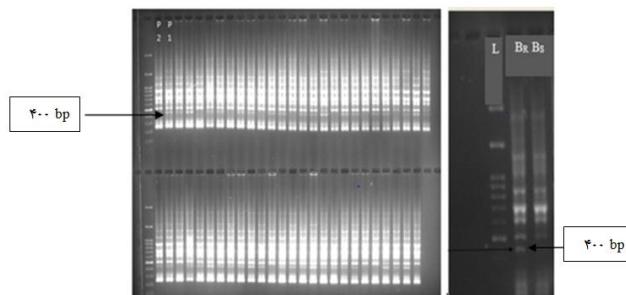
جدول ۵- مشخصات آغازگرهای SCoT مورد استفاده

Table 5. The SCoT primers used in this study

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

شده برای شناسایی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با ژن‌های مقاومت به بلاست 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 ریزماهواره غربیال 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 ژنتیک افراد دو توده (۳۰ فرد) استفاده شدند، اما تنها ۸ آغازگر چند شکلی معنی‌داری نشان دادند (۱۹).

نتایج و بحث
از ۲۰ آغازگر ISSR بررسی شده، در تلاقی 164×1528 یک آغازگر با توالی ۳-AGAGAGAGAGAGAGYT-3 توانست بین بالک‌های مقاوم و حساس با تکثیر قطعه ۴۰۰ bp 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 ریزماهواره، تنها یک آغازگر توانست بین والد و بالک مقاوم تفاوت ایجاد کند (۱). در پژوهش انجام



شکل ۲- الگوی چندشکلی نشانگر ۵ ISSR 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 اسکورهای پایین (صفرو ۱ و ۲) مشاهده شد و دارای ضربی رگرسیون ساده -0.709^{*} بود. با توجه به اینکه اسکورهای بیماری توزیع پیوسته نداشتند، رابطه بین باند و صفت از طریق کای مرربع نیز بررسی شد (جدول ۸).

بررسی رابطه بین نشانگر ISSR و نمره دهنده بیماری از طریق تجزیه تک مارکری باز در بعضی از افراد دارای اسکورهای 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 روی اسکور بیماری
Table 6. Results of regression analysis of 400 bp from ISSR-5 marker on disease score

متغیر	درجه آزادی	میانگین مریعت	Prob
رگرسیون	۱	۱۵/۳۳	.۰/۰۳
خطای رگرسیونی	۱۳۴	۳/۱۸	
کل	۱۳۵		
معادله رگرسیونی			Score= ۲/۵۶۵ - .۰/۷۰۹۷ (۴۰۰) bp

جدول ۷- آزمون کای مرربع برای نشان دادن رابطه بین اسکور بیماری و باند ۴۰۰ جفت باز حاصل از آغازگر ISSR
Table 7. Chi-square test to show the relationship between the 400 bp band ISSR markers

صفات	نسبت مورد انتظار	نمره بیماری	میانگین مریعت	Prob
وجود و عدم وجود باند	۴ و ۵	۲ و ۳	۰ و ۱	۳:۱
	۱۸	۱۰	۱۵	۴:۳
	۵/۴۸۷	۱/۵۹۰	$\chi^2 = ۰/۴۱۴$	
	۱	۳۷	۴۱	۹:۳
	۲/۵۳۷	۰/۷۳۵	$\chi^2 = ۰/۱۹۱$	
	df = ۲	$\chi^2 = ۱۰/۹۵۳^{**}$	$\chi^2 = ۳/۱۷^{ns}$	

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 تدقیک افراد مقاوم و حساس به بیماری مدنظر قرار بگیرد. همانطور که در پژوهش‌های دیگران روی بیماری بلاست فوزاریومی سنبله گندم، رایزومنیا در چندر 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 بهمنظور ارزیابی مقاومت نسبی توتوون 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 شده). 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 95001gpw 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

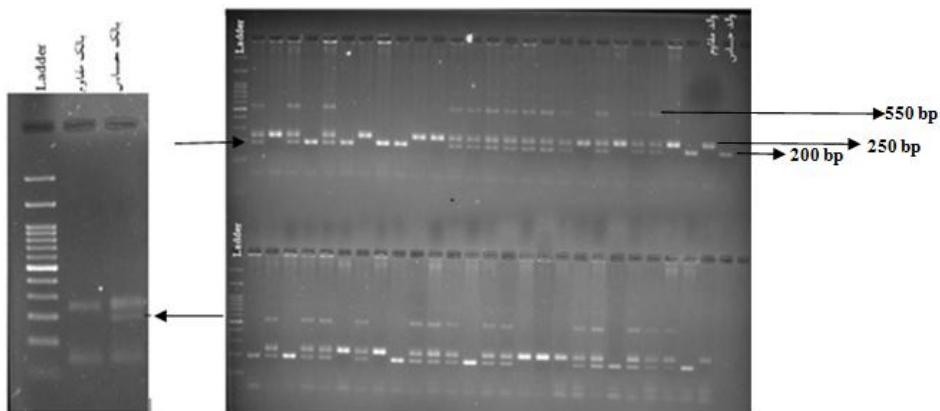
والد مقاوم ژنوتیپ BB و به والد حساس ژنوتیپ AA نسبت ۲۶BB: ۶۰AB: ۱۹AA که با نسبت ساده مندلی ۱:۲:۱ کاملاً مطابقت داشت ($\chi^2 = 2/66^{ns}$). همچنین وجود یک باند حدود ۵۵۰ جفت باز مشاهده شد که افراد هتروزویگوت دارای این باند بودند و نتایج همبستگی بهروش اسپیرمن هم بیانگر این بود که باند ۵۵۰ جفت باز همبستگی 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 آغازگرهای برای این منظور استفاده شود کارایی بیشتری از ISSR را دارند.

آغازگر SSR انجام شد. نتایج نشان داد که از بین این آغازگرهای ۲۸ جفت آغازگر توانستند الگوی نواربندی متفاوتی 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 معروفی 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 هتروزویگوت و هموژیگوت 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

	۵۵۰ جفت باز	۲۵۰ جفت باز	۲۰۰ جفت باز	اسکور بیماری	باند/اسکور
			۱	۱	اسکور بیماری
		-۰/۴۳***	-۰/۳۷**	-۰/۰۴ns	۲۰۰ جفت باز
۱			۰/۵۲۵***	-۰/۰۶۴ns	۲۵۰ جفت باز
				-۰/۱۰۳ns	۵۵۰ جفت باز

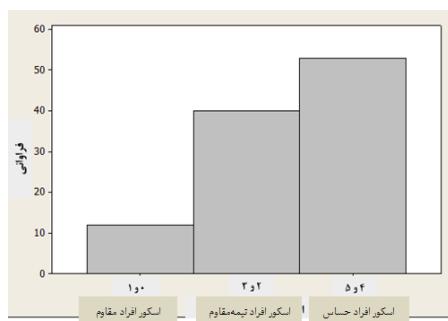


شکل ۳- الگوی چندشکلی نشانگر ریزماهواره gpw95001 در افراد جمعیت F_2 ، بالک‌ها و والدین مقاوم و حساس در تلاقی 1528×1546
Figure 3. Pattern of polymorphic microsatellite markers (gpw95001) in F_2 population, bulks, resistant and susceptible parents of 1546×1528 crossing

کلاس‌های فوتیبی بالدغام نمره‌های ۰ و ۱ باهم به عنوان فوتیپ مقاوم، ۲ و ۳ به عنوان فوتیپ نیمه مقاوم و ۴ و ۵ باهم 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 F_2 و مشاهده فراوانی بیشتر افراد در کلاس‌های حساس، بیانگر غالیت 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 F_2 تلاقی ۱۵۲۸×۱۵۴۶
Figure 4. merge of disease score in F_2 population of 1546 × 1528 cross

جدول ۹- آزمون کای مرربع برای مطابقت نسبت‌های فتوتیپی مشاهده شده با فرضیه ۱: ۹:۶ 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 فتوتیپی	(O _i)	تعداد مشاهده شده	نسبت‌های مورد انتظار (E _i)	تعداد مورد انتظار (E _i)	$\chi^2 = \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$
(aabB) ۱ و ۰	۱۳	۱	۶/۵۶	۶/۳۳	
(A-bb) ۳ و (aaB-) ۲	۴۰	۶	۳۹/۳۷	.۰/۰۱	
(A-B-) ۵ و (A-) ۴	۵۲	۹	۵۹/۰۶	.۰/۰۴	
	۱۰۵	۱۶	۱۰۵		$\chi^2 = ۷/۱۷^{ns}$

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 چندگانه باشد. پژوهش‌های تکمیلی در رابطه با بررسی ژنتیکی مقاومت به این بیماری و پیدا نمودن نشانگرهایی که لینکاز شدید با مقاومت به این بیماری در سطح ژنوم داشته باشد، نیاز به تهیه نقشه لینکازی و تجزیه QTL دارد.

تنوع ژنتیکی افراد در ژرم پلاسم 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، آغازگرها 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 آغازگرها 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 Riese, 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 rapd DNA isolation procedure for small quantitise 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).

- ۵۷
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 céréales. Séances Académie Agricole de France, 21: 501-505.
9. Gholizadeh Vazvani, M., H. Dashti, R. Saberi Raseh and M.R. Bihamta. 2016. Study of relationship between 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 Raseh 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 Raseh 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 graminis* 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 substitutions. Plant Health Progress, 11-24.
15. Linde-Laursen, 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 Exeter.
18. Michelmore, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli. 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. 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. Sadraei, 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. Shazdeh 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 Marker Linked to *Verticillium* Resista 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 Risbeh⁴ 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 regrsion 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