

شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش SSR و EST-SSR مرتبط با مقاومت به زنگ قهوه‌ای در ژنوتیپ‌های گیاه مرتعی *Aegilops tauschii* Coss. در مرحله گیاهچه‌ای و گیاه کامل

حسین محمدی‌دهبالایی^۱، علی اصغر نصراله‌نژادقمی^۲، علی‌اشرف مهربانی اولادی^{۳*}، خلیل زینلی‌نژاد^۴، حسن سلطانیلو^۴

و سید طه دادرزائی^۵

- ۱- دانش آموخته دکترای ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
- ۲- استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
- ۳- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، بخش تحقیقات زیست فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران پست الکترونیک: a.mehrabi@rifr-ac.ir
- ۴- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
- ۵- استادیار، بخش تحقیقات غلات، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۶

چکیده

گونه *Aegilops tauschii* گیاهی است یکساله و دیپلوئید ($2n=2x=14$, DD) که به‌صورت خودرو در دامنه ارتفاعات و یا دشت‌های نزدیک به سواحل دریاهای غیرآزاد، از ترکیه تا چین رویش دارد. از آنجا که نواحی شمالی ایران به‌عنوان یکی از مهمترین مراکز پیدایش و تنوع این گونه مطرح است، شناسایی منابع مقاومت به زنگ قهوه‌ای (برگ) گندم در این مناطق بسیار اهمیت دارد. در این پژوهش، مقاومت گونه مرتعی آزیلوپس تائوشی (*Aegilops tauschii* Coss.) نسبت به شش جدایه مختلف عامل بیماری زنگ قهوه‌ای در مرحله گیاهچه‌ای و گیاه کامل ارزیابی شد. برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با مقاومت گیاهچه به جدایه‌های مختلف و مقاومت گیاه کامل در مزرعه، از نشانگرهای SSR و EST-SSR که پوشش مناسبی روی ژنوم D گندم داشتند، استفاده شد. تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت، نشان داد که ۱۰۰ ژنوتیپ مورد ارزیابی در دو زیرجمعیت متمایز قرار گرفتند. پس از محاسبه ماتریس ضرایب ساختار ژنتیکی و همچنین خویشاوندی در جمعیت (Kinship)، تحلیل ارتباط نشانگر- صفت با استفاده از مدل‌های خطی عمومی و مختلط انجام شد. قطعات تکثیری آغازگرهای ریزماهواره *Xgwm2*، *Xgwm44* و *Xgwm30* که به‌ترتیب بر روی کروموزوم-های 3D، 7D و 2D و همچنین آغازگرهای *SWES186* و *SWEW92* از نشانگرهای EST-SSR که به‌ترتیب بر روی کروموزوم‌های 2D و 7D قرار داشت دارای ارتباط معنی‌دار با سطح مقاومت به بیماری زنگ (با ضریب تبیین بالا) بود. با توجه به ارتباط این نشانگرها با مقاومت اغلب جدایه‌های مطالعه شده، می‌توان نتیجه گرفت که این نشانگرها به‌عنوان نشانگرهای آگاهی‌بخش، ظرفیت بالایی در گزینش ژنومی و غربالگری سریع ژنوتیپ‌ها دارند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه ارتباطی، نشانگر ریزماهواره، EST-SSR، ساختار جمعیت، ماتریس کین شپ.

مقدمه

گونه *Aegilops tauschii* Coss. گیاهی است یکساله و دیپلوئید ($2n=2x=14$, DD) که به صورت خودرو در دامنه ارتفاعات و یا دشت‌های نزدیک به سواحل دریا‌های غیرآزاد، از ترکیه تا چین رویش دارد. به دو گونه از جنس آزیلوپس شامل *Ae. tauschii* و *Ae. cylindrica* اصطلاحاً علف‌بزی بندبند (Jointed Goatgrass) گفته می‌شود که با تولید پنجه‌های فراوان سطح پوشش فراوانی ایجاد می‌کنند و علاوه بر اینکه از ذخایر ژنتیکی گندم محسوب می‌شوند، ارزش حفاظتی بالایی در جلوگیری از فرسایش خاک مراتع دارند (Witcombe, 1983).

همولوژی کامل ژنوم D، *Ae. tauschii* با ژنوم D در گندم نان، وضعیت گیاه‌شناسی و سیتوژنتیکی مشخص، گستره سازگاری اکولوژیک و سهولت تلاقی با گندم، *Ae. tauschii* را به منبع بسیار مهمی برای انتقال ژن و اصلاح گندم تبدیل کرده است. دامنه سازگاری و اهمیت گندم نان (دارای ژنوم D) را می‌توان از این واقعیت استنباط کرد که این گیاه در هر ماه از سال در یکی از نقاط جهان در حال کشت است (Khorami-fard, 2017). با رشد روزافزون جمعیت، افزایش تقاضا برای گندم سالانه به میزان ۱/۶ درصد افزایش خواهد داشت، به طوری که لازم است تا سال ۲۰۵۰ عملکرد تولید گندم به میانگین پنج تن در هکتار برسد (Wheat, 2013). پژوهش‌های مختلف نشان داده است که تنوع موجود در ژنوم D گندم نان کمتر از تنوع موجود در ژنوم D، *Ae. tauschii* است و فقط تعداد محدودی از ژنوتیپ‌های *Ae. tauschii* در پیدایش و تکامل گندم نان نقش داشته‌اند (Lagudah et al., 2006; Pour-). در پژوهشی، از ژن‌های مقاوم به زنگ قهوه‌ای در *Ae. tauschii* برای انتقال به تریتیکاله و تولید واریته‌های مقاوم استفاده شد (Ulaszewski and Michal Tomasz, 2020). در تحقیق دیگر، بررسی خصوصیات *Ae. tauschii* نشان داد که این گونه گیاهی منبع ژنتیکی ارزشمندی برای مقابله با زنگ قهوه‌ای است (Lee et al., 2020).

تنش‌های زنده (آفات و بیماری‌های گیاهی) از عوامل محدود کننده عملکرد محصولات زراعی هستند که همواره سهم عمده‌ای در کاهش عملکرد گندم دارند. اگرچه میزان خسارت ناشی از بیماری‌های گیاهی به عملکرد دانه گندم در سال‌های متفاوت با توجه به شرایط اقلیمی متغیر است اما باید توجه داشت که بیماری‌های گیاهی همواره فعال هستند و در هر مزرعه‌ای با توجه به شرایط محیطی و میزان حساسیت میزبان ظهور پیدا می‌کنند (Singh et al., 2019).

سه نوع بیماری زنگ در گندم، یعنی زنگ نواری یا زرد (Stripe rust)، زنگ برگ یا قهوه‌ای (Leaf rust) و زنگ ساقه یا سیاه (Stem rust) همواره تولید گندم را تحت تأثیر قرار می‌دهند. تخمین زده شده است که میزان کاهش سالانه ناشی از این بیمارگرها بین ۳-۵٪ میلیارد دلار است (Huerta-Espino et al., 2020). زنگ قهوه‌ای گندم، با عامل *Puccinia triticinea* Erickss که به زنگ برگ نیز معروف است، از نظر گستردگی مهمترین بیماری گندم است (Kolmer, 2013). بیمارگر پهنک برگ را مورد حمله قرار می‌دهد، اگرچه در اپیدمی‌های شدیدتر در ارقام حساس، غلاف ساقه و گلوم‌ها نیز مورد حمله قرار می‌گیرند. تحت شرایط همه‌گیری شدید، این بیماری می‌تواند تا بیش از ۴۰ درصد عملکرد را از طریق کاهش وزن هزار دانه و تعداد دانه در سنبله تحت تأثیر قرار دهد (Zhang et al., 2019). زنگ قهوه‌ای با دامنه وسیع گسترش جهانی و قدرت بیماری‌زایی بالای خود از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Huerta-Espino et al., 2011). این بیماری در ایران نیز از مهمترین بیماری‌های گندم به‌شمار می‌رود (Torabi et al., 2001). اگرچه روش‌های مبارزه شیمیایی قادر به کنترل میزانی از خسارت بیماری به عملکرد گندم هستند، ولی مؤثرترین و اقتصادی‌ترین روش مقابله با بیماری‌ها استفاده از ارقام مقاوم به بیماری است (Singh et al., 2019).

اغلب صفاتی که ارزش اقتصادی دارند و با شایستگی افراد مرتبط هستند به صورت کمی و توسط چندین جایگاه ژنی کنترل می‌شوند (Stich et al., 2010; Noori et al., 2015). یکی از کاربردهای مهم نشانگرهای مولکولی، بهبود و افزایش کارایی روش‌های مرسوم اصلاح نباتات از طریق

انتخاب غیرمستقیم توسط نشانگرهای مولکولی پیوسته با صفات است. نشانگرهای مولکولی برای ردیابی صفات تک-ژنی و همچنین در مورد مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی مورد استفاده قرار می‌گیرند. چون نشانگرهای مولکولی تحت تأثیر محیط قرار نمی‌گیرند، در تمام مراحل رشدی گیاه می‌توان از آنها استفاده کرد (Ataee et al., 2013).

البته تا به امروز با استفاده از روش‌های ژنتیکی و آماری در مطالعات ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، نشانگرهای مولکولی گوناگونی مرتبط با ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی (پلی-ژنی) و صفات کیفی (تک‌ژنی) شناسایی شده‌اند که منجر به پیشرفت شگرفی در برنامه‌های غربالگری و گزینش به کمک نشانگر شده است. در شناسایی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات کمی (QTL) مرتبط با صفات مهم در یک جمعیت در حال تفرق نیاز به انجام تلاقی و مدت زمان طولانی برای بدست آوردن جمعیت‌های در حال تفرق می‌باشد. به‌علاوه اینکه تعداد محدودی از ژنوتیپ‌ها به‌عنوان والدین استفاده می‌شوند که این موضوع باعث کاهش تعداد مکان‌های ژنی شناسایی شده در این روش می‌گردد (Braulio and Cloutier 2012). به‌طوری‌که برای غلبه بر این محدودیت‌ها روش تجزیه ارتباطی (Association analysis) مورد استفاده قرار گرفته است. در این روش، دقت بالا به دلیل وجود نوترکیبی‌های تجمعی در جمعیت‌های طبیعی است. روش تجزیه ارتباطی با استفاده از تنوع ژنتیکی گسترده‌تر، نسبت به تجزیه پیوستگی مزیت‌هایی دارد که می‌توان به مکان‌یابی با دقت بالاتر، امکان ردیابی تمامی نشانگرهای پیوسته با صفت مورد نظر و صرفه‌جویی در زمان برای تعیین ارتباط بین صفت با نشانگر اشاره کرد (Flint-Garcia et al., 2003).

تجزیه ارتباطی با شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با نواحی ژنومی درگیر در توارث صفات کمی، با مکان‌یابی بر مبنای عدم تعادل پیوستگی (Linkage disequilibrium) در به‌نژادی مولکولی گیاهان است (Breseghello and Sorrells, 2007). نقشه‌یابی ارتباطی اگر با استفاده از نشانگرهایی با پراکنش و فراوانی بالا در ژنوم انجام شود تحت عنوان مطالعه ارتباط در گستره ژنوم (Genome wide association study (GWAS) نیز شناخته می‌شود که امروزه بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است (Gao et al., 2016).

تجزیه ارتباطی یک آزمایش کنترل شده و محدود نیست، بلکه یک آزمایش طبیعی است. داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی از جمعیتی بدست می‌آید که در آن ارتباط متغیرهای تحقیق توسط محقق کنترل نمی‌شود و روابط میان نشانگرهای ژنتیکی و صفات فنوتیپی در جمعیت ارزیابی می‌شود. وجود عدم تعادل پیوستگی بین ژن‌های کنترل‌کننده یک صفت خاص و یک نشانگر مولکولی می‌تواند ارتباط معنی‌دار نشانگر-صفت را شناسایی و آن را در برنامه‌های به‌نژادی مورد استفاده قرار داد. بنابراین، در نقشه‌یابی ارتباطی بدست آوردن مقدار عدم تعادل پیوستگی بین اطلاعات نشانگرهای مولکولی و صفت فنوتیپی ثبت شده از اهمیت خاصی برخوردار است. در این پژوهش نیز مقاومت ژرم‌پلاسم متنوع (مجموعه محوری) گونه وحشی *A. tauschii* در برابر جدایه‌های مختلف از قارچ عامل بیماری زنگ برگ گندم بررسی شد و علاوه بر شناسایی منابع مقاومت جدید (ژنوتیپ‌های مقاوم)، اقدام به شناسایی و معرفی نشانگرهای مولکولی مرتبط با مقاومت به بیماری زنگ قهوه‌ای شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تعداد ۱۰۰ ژنوتیپ *Ae. tauschii* از کلکسیون غلات و حبوبات دانشگاه ایلام تهیه شد و مورد استفاده قرار گرفت. این نمونه‌ها پس از کشت و ارزیابی در

تجزیه ارتباطی همان کاربرد عدم تعادل پیوستگی است که مفهوم آن تفاوت در فراوانی گامتی مورد انتظار و مشاهده شده است. در این روش با استفاده از طیف متنوع‌تری از ژنوتیپ‌ها، احتمال شناسایی نوترکیبی‌های نادر و تعمیم آن به سایر جمعیت‌ها با دقت بیشتری انجام می‌شود

برای مایه‌زنی شامل یکسری از جدایه‌های غالب استان گرگان و ایلام بودند که در گلخانه‌های تحقیقاتی واحد پاتولوژی غلات مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر خالص‌سازی و روی رقم حساس گندم بولانی برای مایه‌زنی در آزمایش‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای تکثیر شدند (جدول ۱).

برای انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای ژنوتیپ‌ها در گلدان‌هایی به قطر ۱۵ سانتی‌متر حاوی خاک، ماسه و پیت‌ماس کاشته شد و بعد گیاهچه‌های دو برگی با استفاده از ترکیب پودر تالک با اسپور عامل بیماری‌زا (به نسبت ۴ به ۱) مایه‌زنی شدند. بعد از مایه‌زنی، تمامی گلدان‌ها ابتدا در شرایط محیطی با دمای ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت اشباع و تاریکی قرار داده، پس از ۲۴ ساعت به گلخانه‌های مخصوص زنگ قهوه‌ای با دمای ۲۴ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند. سپس تا زمان ارزیابی نمونه‌ها به صورت جداگانه زیر سربوش شفاف کریستالی در دمای ذکر شده به مدت ۱۶ ساعت نور ۱۶۰۰۰ لوکس و هشت ساعت تاریکی قرار گرفتند. در کنار ژنوتیپ‌های *Ae. tauschii* مجموعه ۸۴ تایی ارقام گندم حساس رقم تاچر (Thatcher) ارزیابی شدند (Dadrezaei et al., 2015).

مزرعه برای رسیدن به یکنواختی درون هر نمونه، به صورت تک خوشه تکثیر شدند که از این پس ژنوتیپ گفته می‌شوند. آزمایش به صورت طرح بلوک‌های تصادفی در سه تکرار در مزرعه تحقیقات کشاورزی عراقی محله گرگان انجام شد. این مزرعه با طول جغرافیایی ۵۴ درجه و ۲۵ درجه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۵۴ دقیقه شمالی در ارتفاع ۵/۵ متری از سطح دریا با میانگین بارش ۴۵۰-۴۰۰ میلیمتر در کیلومتر ۶ شمال گرگان واقع شده است. بذر هریک از ژنوتیپ‌ها روی یک خط دو متری کشت شد. منشأ اصلی این ژنوتیپ‌ها در جدول ۴ آمده است.

آزمایش‌های ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌ها به زنگ قهوه‌ای در مرحله گیاهچه‌ای

برای ارزیابی مقاومت به بیماری زنگ قهوه‌ای در مرحله گیاهچه‌ای، مواد آزمایشی در شرایط گلخانه‌ای (گلخانه‌های تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج) ارزیابی شد. آزمایش گلخانه‌ای در شرایط کنترل شده با استفاده از شش جدایه زنگ قهوه‌ای در سه تکرار انجام و صفات تیپ آلودگی (Infection type) و دوره نهان آلودگی (Latent period) محاسبه شد. جدایه‌های مورد استفاده

جدول ۱- کد و محل جمع‌آوری جدایه‌های زنگ قهوه‌ای استفاده شده در آزمایش‌های مزرعه و گلخانه

Table 2. Code and collection place of brown rust isolates used in field and greenhouse experiments

کد Isolate Name	محل جمع‌آوری ایزوله Isolate Location	روش تلقیح Method Incubation
LR-97-11	گلستان، گرگان Golestan, Gorgan	مالشی، پودر تالک Rubbing, talcum powder
LR-98-19	گلستان، گرگان Golestan, Gorgan	مالشی، پودر تالک Rubbing, talcum powder
LR-G32	گلستان، گرگان Golestan, Gorgan	مالشی، پودر تالک Rubbing, talcum powder
LR-98-15	ایلام، موسیان Ilam, Musian	مالشی Rubbing
LR-99-4=H.M	گلستان، گرگان Golestan, Gorgan	مالشی Rubbing
LR-99-15	گلستان، گنبد Golestan, Gonbad	مالش Rubbing

آزمایش‌های ارزیابی مقاومت به بیماری زنگ قهوه‌ای در مرحله گیاه کامل

ژنوتیپ‌های مورد بررسی در اواسط آذر ۱۳۹۸ در شرایط مزرعه‌ای و شرایط همه‌گیری بیماری زنگ قهوه‌ای در مزرعه خزانه زنگ قهوه‌ای، ایستگاه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گرگان ارزیابی شدند (شکل ۱).



شکل ۱- ژنوتیپ‌های آلوده به زنگ قهوه‌ای در مرحله گیاه کامل

Figure 1 - infected Genotypes to brown rust in the field.

هر ژنوتیپ روی یک خط یک متری روی یک پشته کشت شد. رقم حساس بولانی به فاصله هر هفت ژنوتیپ به‌عنوان شاهد و در اطراف خزانه آزمایشی به‌عنوان شیوع دهنده بیماری (Spreader) کشت گردید. برای مایه‌زنی مصنوعی مزرعه آزمایشی، از چهارم اسفندماه ۱۳۹۹ (هر ۱۰ روز یکبار) با استفاده از مخلوطی از جدایه‌ها در هنگام غروب آفتاب و افزایش رطوبت نسبی مزرعه گردپاشی (مخلوط اسپور زنگ و پودر تالک به نسبت ۱ به ۴) انجام شد. در این آزمایش یادداشت‌برداری ۴ مرتبه در مرحله ظهور برگ پرچم و با مشاهده اولین علائم ظهور بیماری روی شاهد حساس به صورت هر هفت روز یکبار و تا زمان رسیدن میزان بیماری به حد نهایی، از طریق درصد پوشش آلوده سطح برگ (۰-۱۰۰) بر اساس روش اصلاح شده کاب (Peterson et al., 1948) و تعیین تیپ آلودگی (Roelfs et al., 1978) انجام گردید.

یادداشت‌برداری تیپ آلودگی (IT) دو هفته بعد از مایه‌زنی بر اساس روش (McIntosh et al., 1995) انجام شد. شرح علائم و تیپ‌های آلودگی مورد استفاده عبارتند از:

- 0: مصون - بدون هیچ گونه علائم؛
 - (فلک): تقریباً مصون - ظهور لکه‌های فوق حساسیت به‌صورت نکروز و یا کلروز بدون اسپور؛
 - 1: مقاوم - جوش‌های کوچک همراه با نکروز؛
 - 2: مقاوم - جوش‌های کوچک تا متوسط همراه با کلروز و نکروز؛
 - 3: نیمه مقاوم - جوش‌های متوسط گاهی همراه با کلروز؛
 - 4: حساس - جوش‌های بزرگ بدون کلروز و نکروز؛
 - X: مقاوم ناهمگن (هتروژن) - ظهور جوش‌هایی با اندازه‌های مختلف روی یک برگ به‌طور پراکنده.
- علاوه بر علائم و تعاریف ذکرشده، علامت - (منها) برای ظهور کمتر از معمول هر یک از تیپ‌های آلودگی و علامت + (بعلاوه) برای ظهور بیشتر از معمول هر یک از تیپ‌های آلودگی در نظر گرفته شدند. تیپ‌های آلودگی 0-2 ناپرآزار (Avirulent) و 3-4 را در مقیاس McIntosh به‌عنوان پرآزار (Virulence) در نظر گرفته شد (McIntosh et al., 1995). برای دستیابی به شکل مناسب برای تجزیه ارتباطی، داده‌های اصلی تیپ آلودگی در مرحله گیاهچه‌ای به فرمت ۰-۹ تبدیل شدند (Zhang et al., 2008). LP یا دوره نهان آلودگی (Latent period) به‌صورت تعداد روز از زمان مایه‌زنی تا ظهور اولین جوش‌های زنگ بر روی برگ‌های گیاه تعریف شد (Vanderplank, 1963). برای ثبت این صفت هر روز به دقت تمامی گیاهچه‌ها مورد بررسی قرار می‌گرفتند و در صورت مشاهده جوش‌ها روی برگ در گیاهان مورد بررسی آن گیاه با یک حلقه رنگی منحصر به فرد برای همان روز نشان‌دار شد و در زمان یادداشت‌برداری نهایی رنگ هر حلقه مشخص‌کننده تعداد روز مشخص از زمان مایه‌زنی تا ظهور اولین جوش‌ها بود.

جدول ۲- مشخصات نشانگرهای SSR و EST-SSR استفاده شده در این پژوهش

Table 2 - Characteristics of SSR and EST-SSR markers used in this research

نشانگر Marker	آغازگر Initiator	توالی ۵' → ۳' 5' → 3' sequence	جایگاه کروموزومی Chromosomal Locus	دمای اتصال Connection temperature (C)
SSR	<i>Xgwm2</i>	F: CTG CAA GCC TGT GAT CAA CT R: CTA TCT CAA ATG ATC GAACA	3D	50
	<i>Xgwm16</i>	FGCTTGACTAGCTAGAGTATCATA R: RCAATCTTCAATTCTGTCGCACGG	5D	50
	<i>Xgwm30</i>	F: ATCTTAGCATAGAAGGGAGTGGG R: TTCTGCACCCTGGGTGAT	2D	60
	<i>Xgwm33</i>	F: GGAGTCACACTTGTGTTGTGCA R: RACTGCACACCTAACTACCTGC	1D	60
	<i>Xgwm44</i>	F: GTTGAGCTTTTCAGTTCGGC R: ACTGGCATCCACTGAGCTG	7D	60
	<i>Xgwm55</i>	F: GCATCTGGTACACTAGCTGCC R: TCATGGATGCATCACATCCT	6D	60
	<i>Xgwm608</i>	F: ACATTGTGTGTGCGGCC R: GATCCCTCTCCGCTAGAAGC	4D	60
EST-SSR	<i>SWES98</i>	F: CTATCCCGATTCCAACCTCC R: CTGTTAGCCAATACGCATTCC	1D	59
	<i>SWES186</i>	F: GGCTCAATCATTCAATCACA R: CTAGAAGTAGGGCGACAACC	2D	57
	<i>SWES221</i>	F: ATTTATTGCCGAGACAGAGC R: CGCCCAAGTCACTCCTCTA	3D	57
	<i>SWES76</i>	F: CTATCCCGATTCCAACCTCC R: CTGTTAGCCAATACGCATTCC	4D	58
	<i>SWES197</i>	F: CTCCTTACTCCCTTTCTTTG R: AAGCAGCATCGTCACATTC	5D	55
	<i>SWES195</i>	F: CAGGACACTGGAAAAGAACA R: GAATTTGACATGGGAGGA	6D	53
	<i>SWES92</i>	F: CAGGACACTGGAAAAGAACA R: CTGCTCCACTACCAGTACAACG	7D	59

نشانه‌گرهای SSR و EST-SSR انتخاب شده روی همه کروموزوم‌های *Ae. tauschii* (جدول ۲)، مواد واکنش در حجم $\mu\text{L} 20$ تهیه (یک میکرولیتر DNA ژنومی و هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت) و بعد واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل Bio-Rad C-1000 انجام شد. پس از انجام واکنش، محصولات بدست آمده با ژل آگارز ۳٪ ولتاژ ۹۰ V بمدت دو ساعت الکتروفورز شده و باندهای حاصل بوسیله رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و در دستگاه ژل داگ عکس برداری شد.

امتیازدهی قطعات تکثیری: داده‌های حاصل از الکتروفورز فراورده‌های تکثیر شده، به صورت صفر (عدم حضور) و یک (حضور) قطعه تکثیری برای هر یک از ژنوتیپ‌ها نمره‌دهی و در نرم افزار اکسل ثبت و ذخیره شد.

تجزیه داده‌های ژنتیکی: برای تعیین ساختار جمعیت، یک تا ۱۰ زیرجمعیت (K) با سه تکرار با استفاده از نرم افزار STRUCTURE-2.3.4 و با ۱۰,۰۰۰ دور (Burnin) و ۱۰۰,۰۰۰ زنجیره MCMC ارزیابی شد. سپس برای تعیین تعداد بهینه K، از روش (Evanno et al., 2005) استفاده شد. انتساب افراد به زیرجمعیت‌ها نیز مطابق روش (Spataro et al., 2011) انجام و برای هر فرد در هر گروه درصد عضویت محاسبه شد. مطابق این روش یک ژنوتیپ هنگامی به یک زیرجمعیت منتسب می‌شود که درصد عضویت آن ۰/۷ یا بیشتر باشد و در صورتی که درصد عضویت کمتر از ۰/۶۹ باشد به عنوان ژنوتیپ مخلوط در نظر گرفته می‌شود. پس از تعیین تعداد K ماتریس Q (ضرایب ساختار جمعیت) بر اساس آن تشکیل می‌شود.

تحلیل ارتباط نشانه‌گر - صفت: برای تحلیل ارتباط صفات مورد مطالعه با نشانه‌گرهای SSR و EST-SSR، از نرم افزار TASSEL استفاده شد (Bradbury et al., 2007). این نرم افزار امکان انجام تمام آزمون‌های مرتبط را با مدل‌های GLM و MLM فراهم می‌کند.

اطلاعات مربوط به شدت بیماری و تیپ آلودگی (R: مقاوم، MR: نیمه مقاوم، MS: نیمه حساس و S: حساس) برای بدست آوردن ضریب آلودگی (Coefficient of Infection) باهم ترکیب شدند. ضریب آلودگی (CI) از حاصل ضرب شدت بیماری در ضریب ثابت مربوط به تیپ آلودگی ($S=1, MS=0.8, MR=0.4, R=0.2$) بدست آمد. در نهایت ضریب آلودگی بدست آمده سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) با استفاده از فرمول زیر حاصل شد.

$$A_k = \sum_{i=1}^{N_i-1} \frac{(y_i + y_{i+1})}{2} (t_{i+1} - t_i)$$

در این فرمول t_i : زمان یادداشت برداری، t_{i+1} : زمان یادداشت برداری بعدی، y_i : ضریب آلودگی در زمان یادداشت برداری، y_{i+1} : ضریب آلودگی در زمان یادداشت برداری بعدی و N: تعداد یادداشت برداری برای ارزیابی ضریب آلودگی است.

منحنی AUDPC: سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) یکی از پارامترهای مهم برای ارزیابی بیماری‌های زنگ در غلات است که تحقیقات فراوانی ارتباط معنی دار آن با نوع واکنش به عامل بیماری‌زا و همچنین کاهش عملکرد در گیاه میزبان را به اثبات رسانیده‌اند و به عنوان یکی از بهترین معیارهای بررسی مقاومت در مرحله گیاه کامل و بازتابی از شدت و توسعه بیماری شناخته می‌شود (E1-Orabey et al. 2019).

تهیه پروفیل مولکولی ژنوتیپ‌های مورد بررسی استخراج DNA: استخراج DNA از برگ‌های سالم و غیر آلوده گیاهان مورد بررسی و بر اساس روش CTAB انجام شد (Saghai Maroof, 1994). ارزیابی کمیت و کیفیت DNA توسط الکتروفورز DNA استخراج شده در ژل آگارز ۰/۸٪ انجام گردید.

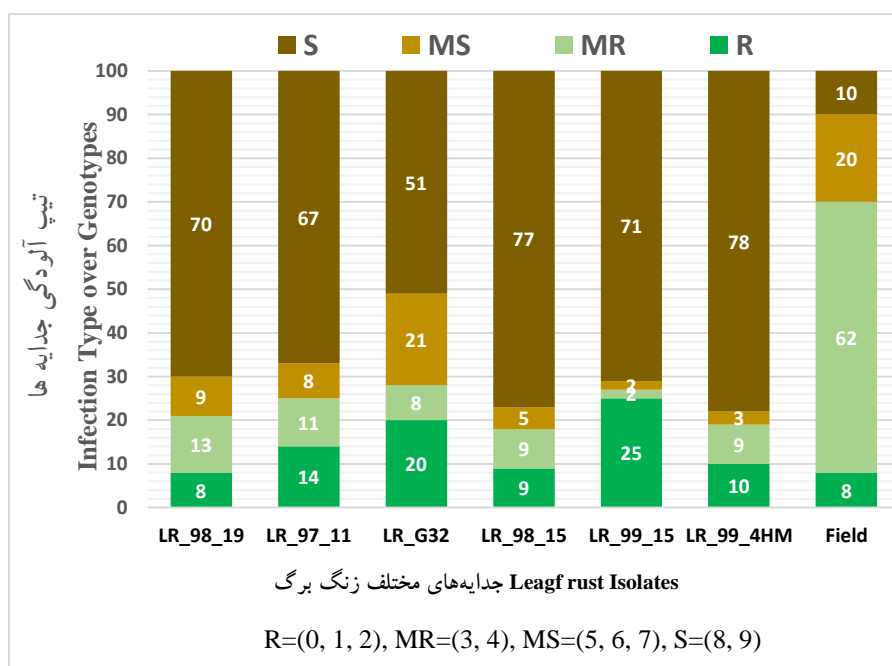
واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): برای تکثیر و بررسی

را به عنوان مقاومت قابل قبول، ۲۵۰-۱۵۰ را نیمه مقاوم و زیر ۱۵۰ را به عنوان مقاوم در نظر گرفتند (Dadrezaei et al., 2015). در تحقیقی دیگر میزان AUDPC بالاتر از ۶۰۰ به عنوان حساس معرفی شد (Anwar et al., 2019). مقاومت ژنوتیپ‌ها در مرحله گیاه کامل به مراتب بیشتر از مرحله گیاهچه‌ای بود، به نحوی که ۷۰ ژنوتیپ مصونیت کامل و مقاومت نسبی نشان دادند. اما در مرحله گیاهچه‌ای بیشترین مقاومت اختصاصی به جدایه LR_G32 و LR_99_15 مربوط بود. پرآزارترین جدایه نیز LR_98_15 بود که فقط ۱۸ ژنوتیپ به آن مقاومت داشتند. منشأ این جدایه استان ایلام منطقه موسیان است که هر ساله انواع زنگ گندم از جمله زنگ قهوه‌ای منجر به افت شدید محصول گندم نان و گندم دوروم در مزارع دشت‌های جنوبی این استان می‌شود.

نتایج و بحث

اطلاعات مربوط به تیپ آلودگی و شدت بیماری، برای تعیین پاسخ ژنوتیپ‌ها به جدایه‌های مختلف در مرحله گیاهچه‌ای (مقاومت عمودی) و مخلوط آنها در مرحله گیاه کامل استفاده شد و در چهار نوع مختلف (R: مقاوم، MR: نیمه‌مقاوم، MS: نیمه‌حساس و S: حساس) گروه‌بندی انجام شد (شکل ۲). در مرحله گیاه کامل، ژنوتیپ‌های با واکنش مصون دارای مقدار AUPDC صفر بودند.

واکنش مصون و بروز حداقل میزان AUPDC احتمالاً به دلیل دارا بودن ژن‌های مقاومت عمومی (غیر اختصاصی) است (E1-Orabey et al., 2019). در آزمایشی برای ارزیابی فنوتیپی مقاومت به بیماری زنگ در برخی ژنوتیپ‌های گندم ایران نیز نتایج مشابه این تحقیق بدست آمد. در این پژوهش محققان میزان AUDPC زیر ۵۰۰ (درصد/روز)



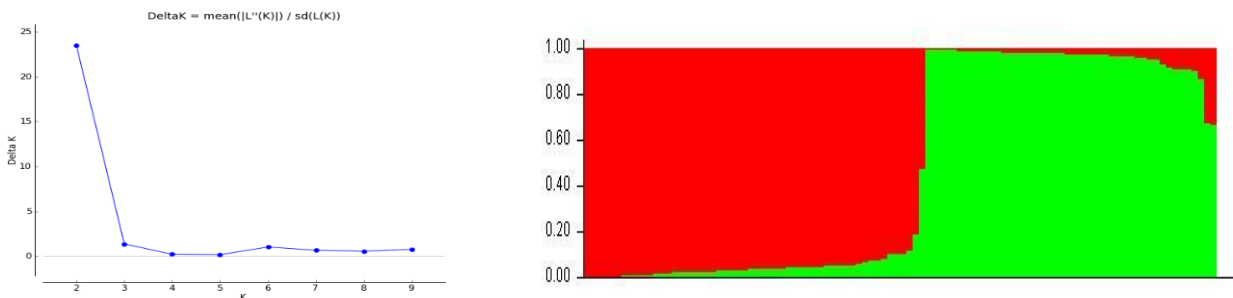
شکل ۲- گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس پاسخ آنها به بیماری زنگ برگ در مرحله گیاهچه‌ای (مقاومت اختصاصی) و در مرحله گیاه کامل (مقاومت غیراختصاصی). تعداد ژنوتیپ‌ها در هر نوع پاسخ برای هر یک از جدایه‌ها و ترکیب آنها در مزرعه مشخص شده است.

Figure 2- Grouping of genotypes based on their response to leaf rust in seedling stage (specific resistance) and in whole plant stage (nonspecific resistance), the number of genotypes in each type of response for each isolate and their composition in the field has been determined.

ساختار ژنتیکی جمعیت

برای تعیین ساختار جمعیت، یک تا ۹ زیرجمعیت (K) با استفاده از نرم افزار STRUCTURE-2.3.4 و با ۱۰,۰۰۰ دور (Burnin) و ۱۰۰,۰۰۰ زنجیره MCMC ارزیابی شد. پیش نیاز مهم برای تجزیه و تحلیل ارتباط نشانگر-صفت، وجود سطح مشخصی از ساختار جمعیت برای کاهش عدم تعادل ارتباط (LD) بین لوکوس‌های مناسب است (Yu et al., 2006). وجود زیرگروه‌ها درون یک جمعیت بزرگ می‌تواند به دلایلی از جمله منشأ جغرافیایی مختلف ژنوتیپ‌ها، انتخاب طبیعی یا انسانی و یا رانش ژنتیکی باشد (Buckler and Thornsberry., 2002). وجود زیرجمعیت‌های درون ژرم پلاسما مورد

ارزیابی با استفاده از نرم افزار Structure بررسی شد. بر اساس نتایج بدست آمده، آماره‌های K و ΔK که به ترتیب تعداد زیرجمعیت و آماره تعیین تعداد بهینه زیرجمعیت هستند، محاسبه و بای-پلات ساختار جمعیت با توجه به این معیارها ترسیم شد. حداکثر مقدار در نمودار ترسیم شده، در $K=2$ مشاهده گردید. بنابراین بر اساس نتایج بدست آمده، وجود دو زیرجمعیت کاملاً متمایز در جمعیت (ژرم پلاسما) مورد مطالعه مشخص شد (شکل ۳). Brbaklic و همکاران (۲۰۱۳) نیز تعداد دو زیرجمعیت را در جمعیتی با این حجم (۹۶ ژنوتیپ مورد بررسی) گزارش کردند.



شکل ۳- بارپلات حاصل از تجزیه ساختار ژنتیکی ۱۰۰ ژنوتیپ *Aegilops tauschii* با استفاده از نرم افزار Structure برای تشخیص تعداد زیرجمعیت در ژرم پلاسما مورد مطالعه بر اساس آماره‌های K و ΔK

Figure 3 - Barplot obtained from genetic analysis of 100 genotypes of *Aegilops Tauschii* using Structure software to detect the number of subpopulations in the studied germplasm based on K and ΔK statistics

آن در شمال ایران است، می‌تواند گواهی بر خاستگاه گونه *Ae. tauschii* در این مناطق باشد. البته، حداکثر تنوع ژنتیکی این گونه در سواحل جنوبی دریای خزر قبلاً در گزارش‌های متعددی آمده است (Singh et al., 2019). زیرجمعیت‌ها، خاستگاه و درصد شرکت در هر زیرجمعیت در جدول ۴ ارائه شده است.

زیرجمعیت اول با ۵۲ ژنوتیپ، شاخص تثبیت کمتری داشت ($F_{ST}=0/0027$) که در واقع نشان‌دهنده سطح اندک تمایز در درون این زیرجمعیت است. در زیرجمعیت دوم با ۴۸ ژنوتیپ میزان شاخص تثبیت ($F_{ST}=0/4381$) مشاهده شد (جدول ۳). شاخص تثبیت زیرجمعیت دوم سطح بالای تنوع بین ژنوتیپ‌های این گروه را نشان می‌دهد. از آنجا که اغلب ژنوتیپ‌های این زیرجمعیت مربوط به رویشگاه‌های

جدول ۳- اطلاعات مربوط به تحلیل ساختار و فاصله ژنتیکی زیرجمعیت‌های استخراج شده

Table 3. Information on the analysis of the structure and genetic distance of the extracted subpopulations

زیرجمعیت Subpopulation	درصد افراد Percentage	شاخص تمایز Fst	فاصله ژنتیکی بین زیرجمعیت‌ها Genetic distance between subpopulations	
			I	II
			I	52
II	48	0.439	0.435	-

جدول ۴- زیرجمعیت‌ها، منشأ و درصد شرکت در هر زیرجمعیت

Table 4 - Subpopulations, origin and communality in each subpopulation.

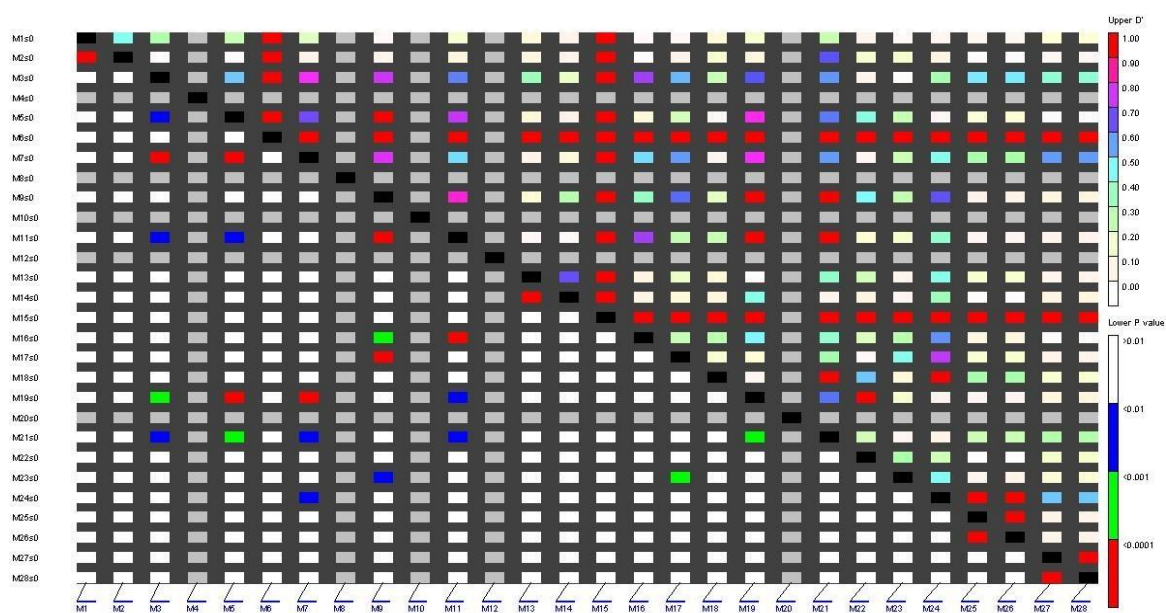
شماره ژنوتیپ NO. Genotype	نام ژنوتیپ Name	منشأ Origin	زیرجمعیت Subpopulation	درصد شرکت در زیرجمعیت ۱ Comunality Sub P1.	درصد شرکت در زیرجمعیت ۲ Comunality Sub P2.	
1	41	ایران-گیلان	Iran-Guilan	1	0.992	0.008
2	295	آذربایجان	Azerbaijan	2	0.016	0.984
3	105	ازبکستان	Uzbekistan	1	0.958	0.042
4	344	ترکیه	Turkey	2	0.006	0.994
5	410	تاجیکستان	Tajikistan	1	0.994	0.006
6	24	ارمنستان	Armenia	1	0.957	0.043
7	c6	ازبکستان	Uzbekistan	2	0.019	0.981
8	367	ارمنستان	Armenia	1	0.979	0.021
9	87	تاجیکستان	Tajikistan	1	0.948	0.052
10	154	ایران-مازندران	Iran-Mazandaran	1	0.915	0.085
11	314	آذربایجان	Azerbaijan	1	0.96	0.04
12	50	آذربایجان	Azerbaijan	1	0.985	0.015
13	374	چین	china	1	0.896	0.104
14	46	ترکیه	Turkey	1	0.974	0.026
15	441	ارمنستان	Armenia	1	0.996	0.004
16	350	ایران-گیلان	Iran-Guilan	2	0.016	0.984
17	322	قزاقستان	Kazakhstan	2	0.007	0.993
18	296	ایران-اردبیل	Iran-Ardabil	2	0.025	0.975
19	7	ترکمنستان	Turkmenistan	2	0.012	0.988
20	13	گرجستان	Georgia	2	0.079	0.921
21	171	ایران-مازندران	In-Mazandaran	1	0.899	0.101
22	409	گرجستان	Georgia	2	0.02	0.98
23	408	روسیه	Russia	2	0.015	0.985
24	158	گرجستان	Georgia	2	0.01	0.99
25	125	ایران-گلستان	Iran- Golestan	2	0.021	0.979
26	c3,1	ترکیه	Turkey	1	0.956	0.044
27	444	ارمنستان	Armenia	1	0.995	0.005
28	72	ترکمنستان	Turkmenistan	1	0.948	0.052
29	292	افغانستان	Afghanistan	2	0.039	0.961
30	445	قزاقستان	Kazakhstan	2	0.528	0.472
31	304	تاجیکستان	Tajikistan	2	0.03	0.97
32	131	افغانستان	Afghanistan	1	0.965	0.035
33	156	ایران-گلستان	Iran- Golestan	2	0.066	0.934
34	71-18	ایران-اردبیل	Iran-Ardabil	1	0.893	0.107
35	233	افغانستان	Afghanistan	1	0.984	0.016
36	141	ترکیه	Turkey	1	0.968	0.032
37	162	گرجستان	Georgia	1	0.883	0.117
38	271	ترکمنستان	Turkmenistan	1	0.944	0.056
39	356	ایران-گلستان	Iran- Golestan	1	0.927	0.073

شماره ژنوتیپ NO. Genotype	نام ژنوتیپ Name	منشأ	Origin	زیرجمعیت Subpopulation	درصد شرکت در زیرجمعیت ۱ Comunality Sub P1.	درصد شرکت در زیرجمعیت ۲ Comunality Sub P2.
40	130	ترکیه	Turkey	1	0.973	0.027
41	379	قزاقستان	Kazakhstan	1	0.962	0.038
42	363	ازبکستان	Uzbekistan	1	0.977	0.023
43	433	ترکمنستان	Turkmenistan	2	0.017	0.983
44	187	چین	China	2	0.016	0.984
45	96	گرجستان	Georgia	2	0.049	0.951
46	14	قزاقستان	Kazakhstan	2	0.086	0.914
47	339	ایران-گیلان	Iran-Guilan	2	0.032	0.968
48	291	تاجیکستان	Tajikistan	1	0.971	0.029
49	335	افغانستان	Afghanistan	2	0.026	0.974
50	444-2	ترکمنستان	Turkmenistan	2	0.329	0.671
51	28	ایران-گیلان	Iran-Guilan	2	0.02	0.98
52	136	روسیه	Russia	1	0.95	0.05
53	359	تاجیکستان	Tajikistan	2	0.014	0.986
54	328	ترکیه	Turkey	2	0.038	0.962
55	221	چین	China	2	0.09	0.91
56	74	ایران-مازندران	Ir-Mazandaran	1	0.991	0.009
57	300	آذربایجان	Azerbaijan	2	0.007	0.993
58	19	ایران-گلستان	Iran- Golestan	1	0.929	0.071
59	15	قزاقستان	Kazakhstan	1	0.955	0.045
60	334	ارمنستان	Armenia	1	0.953	0.047
61	128	افغانستان	Afghanistan	1	0.994	0.006
62	70	قزاقستان	Kazakhstan	1	0.964	0.036
63	197	ایران-اردبیل	Iran-Ardabil	1	0.974	0.026
64	294	ایران-گیلان	Iran-Guilan	1	0.996	0.004
65	318	چین	China	1	0.96	0.04
66	9	آذربایجان	Azerbaijan	1	0.954	0.046
67	186	ایران-گلستان	Iran- Golestan	2	0.022	0.978
68	17	قزاقستان	Kazakhstan	2	0.027	0.973
69	333	تاجیکستان	Tajikistan	2	0.009	0.991
70	429	قزاقستان	Kazakhstan	2	0.004	0.996
71	121	ازبکستان	Uzbekistan	2	0.1	0.9
72	360	ارمنستان	Armenia	1	0.97	0.03
73	281	تاجیکستان	Tajikistan	2	0.026	0.974
74	117	تاجیکستان	Tajikistan	2	0.006	0.994
75	361	ایران-مازندران	Ir-Mazandaran	1	0.05	0.95
76	123	آذربایجان	Azerbaijan	2	0.015	0.985
77	206	ایران-گیلان	Iran-Guilan	2	0.129	0.871
78	99	ترکمنستان	Turkmenistan	1	0.99	0.01
79	160	ایران-گلستان	Iran- Golestan	1	0.965	0.035
80	82	تاجیکستان	Tajikistan	2	0.328	0.672
81	184	روسیه	Russia	2	0.088	0.912
82	325	گرجستان	Georgia	2	0.028	0.972
83	132	ترکمنستان	Turkmanestan	1	0.975	0.025
84	330	ایران-اردبیل	Iran-Ardabil	2	0.033	0.967
85	210	آذربایجان	Azerbaijan	1	0.986	0.014
86	299	ترکمنستان	Turkmenistan	1	0.958	0.042
87	305	ترکیه	Turkey	1	0.944	0.056
88	414	ترکیه	Turkey	1	0.977	0.023
89	153	ایران-مازندران	Ir-Mazandaran	1	0.989	0.011
90	439	ایران-گلستان	Iran-Golestan	1	0.936	0.064
91	124	ازبکستان	Uzbekistan	1	0.927	0.073

شماره ژنوتیپ NO. Genotype	نام ژنوتیپ Name	منشأ	Origin	زیرجمعیت Subpopulation	درصد شرکت در زیرجمعیت ۱ Comunality Sub P1.	درصد شرکت در زیرجمعیت ۲ Comunality Sub P2.
92	323	ترکمنستان	Turkmenistan	1	0.955	0.045
93	164	ایران-گلستان	Iran- Golestan	1	0.978	0.022
94	356	آذربایجان	Azerbaijan	2	0.024	0.976
95	298	ترکیه	Turkey	2	0.01	0.99
96	c6	افغانستان	Afghanistan	1	0.814	0.186
97	351	ترکیه	Turkey	2	0.033	0.967
98	273	افغانستان	Afghanistan	2	0.013	0.987
99	214	ایران-گیلان	Iran-Guilan	1	0.993	0.007

می‌دهد. برای اینکه این ارتباط غیرتصادفی معرف عدم تعادل فاز گامتی باشد، بین تمام قطعات تکثیرشده به صورت جفتی آماره عدم تعادل پیوستگی محاسبه شد. ماتریس ضرایب ساختار ژنتیکی جمعیت (ضرایب Q برای هر زیرجمعیت) به عنوان کوفکتور لحاظ شد که احتمال گزارش ارتباط معنی دار کاذب بین نشانگر صفت به دلیل اثر ساختار جمعیت کاهش یابد (Flint-Garcia et al., 2003).

عدم تعادل پیوستگی (LD): برای نمایش مقدار عدم تعادل بین مکان‌های ژنی (نشانگری) در سطح ژنوم، ماتریس عدم تعادل براساس آماره D' بین تمام قطعات (الل‌های) تکثیرشده، محاسبه و نمودار حرارتی آن همراه با سطوح معنی داری ترسیم شد (شکل ۴). ملاحظه می‌شود که بین برخی از آلل‌های تکثیرشده عدم تعادل پیوستگی معنی دار مشاهده می‌شود که در واقع ارتباط غیرتصادفی آلل‌ها بین جایگاه‌های ژنی را نشان



شکل ۴- عدم تعادل پیوستگی بین قطعات تکثیری (آلل‌های) مربوط به نشانگرهای مختلف (بالای قطر LD پلات مقادیر آماره D' و در پایین آن سطح معنی داری P-Value مشخص شده است. مقیاس سطح احتمال معنی دار با رنگ‌های مختلف مشخص شده است).

Figure 4 – Linkage Disequilibrium of alleles (amprelated to different markers (above the diameter of the LD plot, the values of the statistic D' and below it, the significance level of P-value is specified. Different significant levels have been shown with various colours).

تحلیل ارتباط نشانگرها با مقاومت به زنگ: مدل خطی عمومی (GLM) برای شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش

مرتبط با مقاومت اختصاصی ژرم پلاسما ارزیابی شده به جدایه‌های مختلف و همچنین مقاومت عمومی (غیراختصاصی) به همه جدایه‌ها در شرایط مزرعه استفاده شد. برای اطمینان از گزارش ارتباط مثبت-کاذب بین نشانگر-صفت، از مدل خطی آمیخته (MLM) استفاده شد. نتایج تجزیه ارتباط نشانگر صفت‌های معنی‌دار در جدول‌های ۵ و ۶ آمده است.

برای مقاومت به جدایه Lr-97-11 سه نشانگر ریزماهواره در مجموع با ضریب تبیین ۰/۳۹ (بر روی

کروموزوم‌های 2D، 3D، 7D) و دو نشانگر EST-SSR با ضریب تبیین ۰/۱۸۸ (بر روی کروموزوم‌های ۲ و ۷) شناسایی شدند. چهار نشانگر ریزماهواره نیز با مقاومت به جدایه LR-98-15 ارتباط معنی‌داری نشان دادند که در مجموع ضریب تبیین ۰/۲۷۱ را داشتند و بر روی کروموزوم‌های ۲ و ۷ قرار دارند. از نشانگرهای EST-SSR نیز دو نشانگر بر روی همین کروموزوم‌ها شناسایی شد. مقاومت به جدایه LR-98-19 نیز با دو نشانگر ریزماهواره روی کروموزوم‌های ۲ و ۳ ارتباط معنی‌داری نشان داد.

جدول ۵- نشانگرهای SSR مرتبط با مقاومت به جدایه‌های زنگ برگ مورد مطالعه در ۱۰۰ ژنوتیپ آژیلوپس تائوشی

Table 5 - SSR markers related to resistance to leaf rust isolates studied in 100 genotypes of *Aegilops tauschii*

مقاومت به جدایه Isolation Resistance	نشانگر مرتبط Related Markers	جایگاه کروموزومی Chromosomal Locus	سطح معنی‌دار GLM Model P- Value	سطح معنی‌دار MLM Model P-Value	ضریب تبیین R ²	جمع ضریب تبیین Sum of R ²
LR-97-11	Xgwm30	2D	0.005	0.007	0.102	0.390
	Xgwm2	3D	0.005	0.007	0.102	
	Xgwm44	7D	0.006	0.010	0.186	
LR-98-15	Xgwm30	2D	0.000	0.001	0.187	0.271
	Xgwm44	7D	0.030	0.045	0.084	
LR-98-19	Xgwm30	2D	0.028	0.042	0.044	0.073
	Xgwm2	3D	0.046	0.069	0.029	
LR-99-15	Xgwm30	2D	0.018	0.027	0.119	0.290
	Xgwm2	3D	0.023	0.035	0.051	
	Xgwm44	7D	0.017	0.026	0.120	
LR-99-4	Xgwm30	2D	0.002	0.003	0.128	0.599
	Xgwm55	6D	0.012	0.018	0.072	
	Xgwm44	7D	0.003	0.005	0.238	
	Xgwm2	3D	0.001	0.001	0.161	
LR-G32	Xgwm2	3D	0.006	0.008	0.097	0.197
	Xgwm44	7D	0.023	0.035	0.10	
Field IT	Xgwm30	2D	0.034	0.103	0.082	0.195
	Xgwm2	3D	0.017	0.025	0.059	
	Xgwm44	6D	0.048	0.066	0.054	

در مجموع با ضریب تبیین ۰/۲۹۰ (بر روی کروموزوم‌های

برای مقاومت به جدایه Lr-99-15 سه نشانگر ریزماهواره

(۷، ۲ و ۶) شناسایی شد. مقاومت به جدایه LR-G 32 نیز با دو نشانگر ریزماهواره روی کروموزوم‌های (۳ و ۷) با ضریب تبیین ۰/۱۹۷ و سه نشانگر EST-SSR با ضریب تبیین ۰/۱۷۴ (بر روی کروموزوم‌های ۲، ۶ و ۷) ارتباط معنی‌داری نشان داد.

و دو نشانگر EST-SSR با ضریب تبیین ۰/۱۴۵ (بر روی کروموزوم‌های ۲ و ۷) شناسایی شد. چهار نشانگر ریزماهواره نیز با مقاومت به جدایه LR-99-4 ارتباط معنی‌داری نشان دادند که در مجموع ضریب تبیین ۰/۵۹۹ را داشتند و بر روی کروموزوم‌های ۲، ۶، ۳ و ۷ قرار دارند. از نشانگرهای EST-SSR نیز سه نشانگر بر روی کروموزوم‌های

جدول ۶- نشانگرهای EST-SSR مرتبط با مقاومت به جدایه‌های زنگ برگ مورد مطالعه در ۱۰۰ ژنوتیپ آژیلوپس تائوشی

Table 6 – EST-SSR markers related to resistance to leaf rust isolates studied in 100 genotypes of *Aegilops tauschii*

مقاومت به جدایه Isolation Resistance	نشانگر مرتبط Related Markers	جایگاه کروموزومی Chromosomal Locus	سطح معنی‌دار GLM Model P- Value	سطح معنی‌دار MLM Model P-Value	ضریب تبیین R ²	جمع ضریب تبیین Sum of R ²
LR-97-11	SWES92	7D	0.005	0.008	0.101	0.188
	SWES186	2D	0.011	0.008	0.087	
LR-98-15	SWES186	2D	0.018	0.027	0.059	0.099
	SWES92	7D	0.003	0.039	0.040	
LR-98-19	SWES186	2D	0.007	0.011	0.086	0.140
	SWES195	6D	0.018	0.028	0.054	
LR-99-15	SWES186	2D	0.009	0.013	0.080	0.145
	SWES92	7D	0.015	0.022	0.065	
LR-99-4	SWES92	7D	0/005	0.008	0.233	0.344
	SWES186	2D	0.012	0.018	0.072	
	SWES195	6D	0.033	0.050	0.039	
LR-G32	SWES195	6D	0.017	0.025	0.061	0.174
	SWES92	7D	0.028	0.069	0.030	
	SWES186	2D	0.008	0.013	0.083	
Field IT	SWES186	2D	0.015	0.022	0.046	0.163
	SWES92	7D	0.022	0.032	0.051	
	SWES197	5D	0.035	0.052	0.037	
	SWES221	3D	0.046	0.068	0.029	

با بررسی سطح معنی‌داری نشانگرها مشخص شد که نشانگرهای Xgwm2، Xgwm44 و Xgwm30 در بین

(Lagudah et al., 2009).

با بررسی مکان‌های ژنی Lr1, Lr15, Lr19, Lr21, Lr22a, Lr32, Lr34, Lr54, Lr67 و Lr39 که عمده ژن‌های شناخته شده برای مقاومت به زنگ قهوه‌ای هستند، مشخص شد که این ژن‌ها بر روی کروموزوم D قرار دارند (Neelam et al., 2013). در واقع دو گونه *speltoides* و *tauschii* به‌عنوان گونه‌های اهداکننده این ژنوم‌ها جزو نزدیک‌ترین خویشاوندان وحشی گندم شناخته شده‌اند و در بسیاری از پژوهش‌های انجام شده در رابطه با ظرفیت اصلاحی گونه‌های خویشاوند گندم در برابر بسیاری از تنش‌های زیستی و غیرزیستی به اهمیت این گونه‌ها اشاره شده است. در سال‌های اخیر استفاده از ابزارهای بیوتکنولوژی مانند ژنومیکس کارکردی، متابولومیکس، پروتئومیکس و ترانسکریپتومیکس نقش بالایی در فراهم کردن اطلاعات تکمیلی در رابطه با به‌نژادی و به‌ویژه مقاومت به انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاهان داشته‌اند. نتایج پژوهش‌های متعدد نشان داده است که استفاده از این ابزارهای نوین تأثیر قابل توجهی در تسریع، افزایش دقت، کاهش هزینه‌ها و پیشرفت برنامه‌های به‌نژادی دارد و نیاز است که استفاده از آنها به صورت روش مستمر و هدفمند در برنامه‌های آینده مورد توجه پژوهشگران قرار گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

تحلیل ساختار ژنتیکی جمعیت مورد بررسی، وجود دو زیرجمعیت کاملاً متمایز از هم را نشان داد، به‌طوری‌که با لحاظ ضرایب ساختار ژنتیکی جمعیت در تجزیه ارتباطی، مشخص شد که نشانگرهای *Xgwm2* و *Xgwm44* و *Xgwm30* در بین نشانگرهای SSR که به‌ترتیب بر روی کروموزوم‌های 3D، 7D و 2D قرار دارند و *SWES186* و *SWEW92* در بین نشانگرهای EST-SSR که به‌ترتیب بر روی کروموزوم‌های 2D و 7D قرار دارند بیشترین R^2 و بالاترین سطح معنی‌داری را در هر دو مدل GLM و MLM در رابطه با صفات مورد بررسی داشتند. این نشانگرها با

نشانگرهای SSR و *SWES186* و *SWEW92* در بین نشانگرهای EST-SSR بیشترین R^2 و بالاترین سطح معنی‌داری را در هر دو مدل GLM و MLM داشتند. نشانگرهای *Xgwm2*، *Xgwm44* و *Xgwm30* در بین نشانگرهای SSR و در بین نشانگرهای EST-SSR، *SWES186* و *SWEW92* در مقاومت به بیشتر جدایه‌ها مشترک و با هم مرتبط بودند که این موضوع نشان‌دهنده پلیوتروپی یا مجموعه‌ای از ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت (QTLs) در این نواحی ژنومی است.

سه نشانگر ریزماهواره در مجموع با ضریب تبیین ۰/۱۹۵ (بر روی کروموزوم‌های 2D، 3D و 6D) و چهار نشانگر EST-SSR با ضریب تبیین ۰/۱۶۳ (بر روی کروموزوم‌های 2D، 5D، 7D و 3D) شناسایی شد که برای مقاومت عمومی گونه *Ae. tauschii* در مرحله گیاه کامل آگاهی‌بخش می‌باشد.

مکان‌های ژنی شناخته شده در رابطه با مقاومت در مرحله گیاه کامل همواره در سراسر دنیا در برنامه‌های اصلاح گندم بررسی می‌شوند. از جمله مهمترین این مکان‌های ژنی می‌توان *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38*، *Lr46/Yr29/Sr58/Pm39* و *Lr67/Yr46/Sr55/Pm46* را نام برد (Singh et al., 2011; William et al., 2003) که در این میان مکان ژنی *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38* از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این مکان ژنی با داشتن ژن *Lr34* که به‌عنوان ژن‌های *Yr18* برای مقاومت به زنگ زرد، *Sr57* برای مقاومت به زنگ سیاه و *Pm38* برای مقاومت بیماری سفیدک پودری هم شناخته می‌شود یکی از مؤثرترین مکان‌های ژنی کنترل‌کننده بیماری‌های زنگ در گندم به‌شمار می‌رود (Lagudah et al., 2009). این مکان ژنی که روی بازوی کوتاه کروموزوم 7D قرار دارد در مقایسه با گیاهان حساس باعث بروز دوره نهان آلودگی طولانی‌تر، جوش‌های کمتر و در اندازه کوچکتر در دو هفته بعد از آلودگی می‌شود. یادآوری می‌شود که پژوهش‌های متعدد انجام شده، پرآزای بیماری‌گر زنگ قهوه‌ای روی این جایگاه ژنی مشاهده نشده است

- Buckler, E.S., Thornsberry, J.M. 2002. Plant molecular diversity and applications to genomics: Current opinion in plant biology 5: 107-111.
- Cloutier, S., McCallum, B.D., Loutre, C., Banks, T.W., Wicker, T., Feuillet, C., Keller, B., Jordan, M.C. 2007. Leaf rust resistance gene Lr1, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large psr567 gene family. Plant Molecular Biology 65:93-106.
- Dadrezaei, S., Afshari, F., Patpour, M., 2015. Evaluation of phenotypic resistance to rusts in some Iranian wheat genotypes in greenhouse and field conditions: Seed and Plant Improvement 31(3): 531-546. (In Persian)
- Dyck, P.L. 1987. The association of a gene for leaf rust resistance with the chromosome 7D suppressor of stem rust resistance in common wheat. Genome 29:467-469.
- El-Orabey, W.M., Hamwieh, A., Ahmed, S.M. 2019. Molecular markers and phenotypic characterization of adult plant resistance genes Lr 34, Lr 46, Lr 67 and Lr 68 and their association with partial resistance to leaf rust in wheat: Journal of genetics 98(3): 1-12.
- El-Orbey, W.M., Hamwieh, A., Ahmed, S.M. 2019. Molecular markers and phenotypic characterization of adult plant resistance genes Lr34, Lr46, Lr67 and Lr68 and their association with partial resistance to leaf rust in wheat: Journal of Genetics 98:82.
- Esfandiari, E. 1948. Troisième liste des fungi ramassés en Iran: Applied Entomology and Phytopathology 8: 1-15.
- Evanno G. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study Molecular Ecology. 14: 2611-2620.
- Feuillet, C., Messmer, M., Schachermayr, G., Keller, B. 1995. Genetic and physical characterization of the Lr1 leaf rust resistance locus in wheat (*Triticum aestivum* L.). Molecular Genetics and Genomics 248: 553-562.
- Flint-Garcia, S.A., Thornsberry, J.M., Ivon, B. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants: Annual Review of Plant Biology. 54: 357-374.
- Gao L, Kathryn T, Shiaoan C, Kolmer J, Anderson J. 2016. Genome-wide association study of seedling and adult plant leaf rust resistance in elite spring wheat breeding lines. Plos one. 11(2): 1-25.
- Huang, L., Gill, B.S. 2001. An RGA-like marker detects all known Lr21 leaf rust resistance gene family members in *Aegilops tauschii* and wheat. Theoretical and Applied Genetics 6-7:1007-1013.
- Huerta-Espino, J., Singh, R., Crespo-Herrera, L.A., Villaseñor-Mir, H.E., Rodriguez-Garcia, M.F., Dreisigacker, S., Barcenar-Santana, D., Lagudah, E. 2020. Adult plant slow rusting genes confer high مقاومت اختصاصی *Ae.tauschii* به اغلب جدایه‌های مورد استفاده مرتبط بودند. برای مقاومت عمومی (غیراختصاصی گونه *Ae.tauschii* در مرحله گیاه کامل (مزرعه) نیز سه نشانگر ریزماهواره بر روی کروموزوم‌های 2D، 3D و 6D و چهار نشانگر EST-SSR بر روی کروموزوم‌های 2D، 7D، 5D و 3D شناسایی شد. با توجه به تکرارپذیری بالای نشانگرهای SSR و EST-SSR، می‌توان از نشانگرهای آگاهی‌بخش شناسایی شده در گزینش ژنومی برای مقاومت به زنگ برگ در گندم‌های دارای ژنوم D استفاده کرد.

منابع مورد استفاده

- Abdurakhmonov, I.Y., Abdukarimov, A., 2008. Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources: International Journal of Plant Genomics 5: 1-18.
- Ataiee, R., Mohammadi, W., Talei, A., and M. R., Naghavi. 2013. Communication mapping of root traits in barley, Iranian Crop Sciences, 347-357. (In Persian)
- Anwar, M.J., Javad, M. and Jamil, M.W., Habib, I., Nazir, N., Rehman, S., Iqbal, M.Z., Kamran, M., Ehetisham, ul. and haq, M. 2019. Response of wheat genotypes for resistance against rust (*Puccinia titicina* Eriks.) under field conditions: Plant Protection. 3 (1): 35-39.
- Autrique, E., Singh, R.P., Tanksley, S.D., Sorrells, M.E. 1995. Molecular markers for four leaf rust resistance genes introgressed into wheat from wild relatives. Genome 38:75-83.
- Bamdadian, A. 1993. Evaluation of physiological race of rusts of grass and their modification in Iran: Iranian Research Institute of Plant Protection Evin Iran 10p. (In Persian)
- Bradbury, P. 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics. 23(19) 2633-2635.
- Braulio, J.S., Cloutier, S. 2012. Association mapping in plant genomes: Genetic Diversity in Plants. Intech Press. 29-55.
- Brbaklic, L., Trkulja, D., Kondic-spika, A., Treskic, S., Kobiljski, B. 2013. Detection of QTLs for important agronomical traits in hexaploid wheat using association analysis. Plant Breed 49 (1): 1-8.
- Breseghello, F., M.E., Sorrells., 2007. QTL analysis of kernel size and shape in two hexaploidy wheat mapping populations: Field Crops Research 101: 172-179.

- leaves and stems of cereals: Canadian journal of research 26(5): 496-500.
- Pour-Aboughadareh, A. R., Moghaddam, M., Alavikia, S., Mehrabi, A. A. 2016. Assessing heritability of agro-morphological characters and relationship between genetic diversity with geographical factors in Einkorn wild wheat populations collected from West and Northwest of Iran. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic. 24(2): 287-304. (In Persian)
 - Prins, R., Groenewald, J.Z., Marais, G.F., Snape, J.W., Koebner, R.M.D. 2001. AFLP and STS tagging of Lr19, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. Theoretical and Applied Genetics 103:618-624.
 - Roelfs, A.P. 1978. Estimated losses caused by rust in small grain cereal in the United States: Miscellaneous Publication USDA: 1- 85.
 - Saghai-Marouf, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A., Allard, R.W., 1984. PNAS 81 (24) : 8014-8018.
 - Singh N., Wu S., Tiwari V., Sehgal S., Raupp J., Wilson D., Abbasov M., Gill B., Poland J., 2019. Genomic Analysis Confirms Population Structure and Identifies Inter-Lineage Hybrids in *Aegilops tauschii*. Front. Plant Sci. 10(9) 1-13.
 - Singh, A., Pallavi, J.K., Gupta, P., Prabhu, K.V., 2011. Identification of microsatellite markers linked to leaf rust adult plant resistance (APR) gene Lr48 in wheat. Plant Breeding 130:31-34.
 - Singh, N., Wu, S., Tiwari, V., Sehgal, S., Raupp, J., Wilson, D., Abbasov, M., Gill, B., Poland, J., 2019. Genomic Analysis Confirms Population Structure and Identifies Inter-Lineage Hybrids in *Aegilops tauschii*. Frontiers in Plant Science. 10(9) 1-13.
 - Spataro, G., Tiranti, B., Arcaleni, P. 2011. Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. Theoretical and Applied Genetics. 122: 1281-1291.
 - Stich, B., Melchinger, A. E. 2010. An introduction to association mapping in plants: CAB Reviews. 5: 1-9.
 - Talbert, L.E., Blake, N.K., Chee, P.W., Blake, T.K., Magyar, G.M. 1994. Evaluation of "sequence-tagged-site" PCR products as molecular markers in wheat. Theoretical and Applied Genetics 87:789-794.
 - Thabet, M., Najeeb, M.A. 2017. Impact of Wheat Leaf Rust Severity on Grain Yield Losses in Relation to Host Resistance for Some Egyptian Wheat Cultivars: Middle East Journal of Agriculture. 6 (4): 1501-1509.
 - Torabi, M., Nazari, K., Afshari, F. 2001. Genetic of pathogenicity of *Puccinia recondita* F.Sp. Tritici, the causal agent of leaf rust of wheat: Iranian Journal Agricultural Science, 32(3): 625-635. (In Persian)
 - Ulaszewski, W., Tomasz, M. 2020. *Aegilops* Species for the Improvement of the Leaf and Stripe Rust levels of resistance to rusts in bread wheat cultivars from Mexico: Frontiers in Plant Science 11: 824.
 - Huerta-Espino, J., Singh, R.P., Germanm, S., McCallumm, B.D., Park, R.F., Chen, W.Q., Bhardwaj, S.C. 2011. Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*: Euphytica 179: 143-160.
 - Krattinger, S.G., Lagudah, E.S., Spielmeier, W., Singh, R.P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., Bossolini, E., Selter, L.L., Keller, B. 2009. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. Science 323:1360-1363.
 - Lagudah, E.S., McFadden, H., Singh, R.P., Huerta-Espino, J., Bariana, H.S., Spielmeier, W. 2006. Molecular genetic characterization of the Lr34/Yr18 slow rusting resistance gene region in wheat. Theoretical and Applied Genetic 114:21-30.
 - Lagudah, E.S., Krattinger, S.G., Herrera-Foessel, S. 2009. Gene-specific markers for the wheat gene Lr34/Yr18/Pm38 which confers resistance to multiple fungal pathogens. Theoretical and Applied Genetics 119:889-898.
 - Lee, A., Trinh, A.c., Lee, W.J., Kim. m., Lee. H., Pathiraja. D., Choi. I., Chung. N., Choi. C., Lee. B.C., Lee. H. 2020. Characterization of two leaf rust-resistant *Aegilops tauschii* accessions for the synthetic wheat development. I. Applied Biological Chemistry. 63(13): 1-14.
 - McIntosh, R.A., Welling, C.R., Park, R.F. 1995. Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes: CSIRO publications, Victoria, Australia. PP: 201.
 - Khorami-fard, T; Mehrabi, A. A., Arminian, A., Fazeli, A. 2017. Genetic diversity structure of *Aegilops crassa* accessions revealed by genomic ISSR markers. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic. 25(1), 111-122. (In Persian)
 - Neelam, K., Brown-Guedira, G., Huang, L., 2013. Development and validation of a breeder-friendly KASPar marker for wheat leaf rust resistance locus Lr21. Molecular Breeding 31:233-237.
 - Noori, A., Mehrabi, A., Safari, H. 2015. Morphological evaluation and drought tolerance indices of *Aegilops cylindrica* accessions in Ilam. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic. 23(2): 259-276. (In Persian)
 - Peterson, G., Seberg, O., Yde, M., Berthelsen, K. 2006. Phylogenetic relation of *Triticum* and *Aegilops* evidence for the origin of the A, B and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*): Molecular Phylogenetic and Evolution. 39:70-82.
 - Peterson, R.F., Campbell, A.B., Hannah, A.E. 1948. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on

- Yu, J., Buckler, E.S. 2006. Genetic association mapping and genome organization of maize: Current Opinion in Biotechnology. 17: 155-160.
- Zhang, P., Li, X., Gebrewahid, T.W., Liu, H., Xia, X., He, Z., Li, Z., Liu, D. 2019. QTL mapping of adult-plant resistance to leaf and stripe rust in wheat cross SW 8588/Thatcher using the wheat 55K SNP array: Plant disease 103(12): 3041-3049.
- Zhang, W., Dubcovsky, J. 2008. Association between allelic variation at the Phytoene synthase 1 gene and yellow pigment content in the wheat grain. Theoretical and Applied Genetics 116: 635-645.
- Resistance in Cultivated Triticale (\times Triticosecale Wittmack). Agronomy. 1991(10): 1-8.
- Vanderplank, J.E., (1963) Plant Disease. Epidemics and Control: Accademic Press New York. PP: 349.
- William, M., Singh, R.P., Huerta-Espino, J., Ortiz Islas, S., Hoisington, D. 2003. Molecular marker mapping of leaf rust resistance gene Lr46 and its association with stripe rust resistance gene Yr29 in wheat. Phytopathology 93:153-159.
- Witcombe, J. R. 1983. A Guide to the Species of Aegilops L.: Their Taxonomy, Morphology, and Distribution. International Board for Plant Genetic Resources (IPGRI), Rome, Italy. PP: 77.

Identification of SSR and EST-SSR Informative markers associated to leaf rust resistant in *Aegilops tauschii* in seedling and adult-plant stages

H. Mohammadi Dehbalaei¹, A. A. Nasrollah Nejadghomi², A. A. Mehrabi Oladi^{3*},
K. Zeinalinejad², H. Sultanlu⁴, S. T. Dadrezaei⁵

1- PhD graduated in Genetics and Plant Breeding, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2- Assist. Prof. Dept. Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agriculture and Natural Resources Sciences, Gorgan, Iran.

3* - Corresponding author, Assoc. Prof. Dept. Biotechnology, Research Institute of Forest and rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. E-mail: a.mehrabi@rifr-ac.ir

4- Assoc. Prof. Dept. Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agriculture and Natural Resources Sciences, Gorgan, Iran.

5- Assist. Prof. Dept. Cereals Research, Seed and Plant Improvement Institute Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: 04.01.2022

Accepted: 25.02.2022

Abstract

Aegilops tauschii Coss is an annual and diploid plant ($2n = 2n = 14$, DD) that grows as a wild weed in the highlands or plains near the shores of the high seas, from Turkey to China. Since the northern regions of Iran are considered as one of the most important centers of origin and diversity of this species, it is very important to identify sources of resistance to brown rust (wheat leaves) in these regions. In the present study, the resistance of rangeland species, *Aegilops tauschii* Coss., to six isolates of brown rust was evaluated in seedling and adult plant stages. SSR and EST-SSR markers with proper coverage on D genomes of wheat were applied to identify marker-trait association (MTA). Analysis of population genetic structure showed that the 100 investigated genotypes separated in two distinct sub-populations. Association analysis among markers and phenotypic data was conducted out based on the Kinship coefficients using generalized linear and mixed linear models. Significant associations among markers and traits obtained for amplified fragments of *Xgwm2*, *Xgwm44* and *Xgwm30* primers correspondingly located on 3D, 7D & 2D chromosomes, respectively. Furthermore, EST-SSR primers *SWES186* and *SWES92* correspondingly located on 2D & 7D chromosomes, respectively. These associated markers have the highest R^2 coefficients for resistance level to leaf rust disease. Informative markers with association to most isolates could be exploited for genomic selection and early screening of genotypes for resistance to leaf rust.

Keywords: *Aegilops tauschii* Coss, Association analysis, Microsatellite marker, EST-SSR, Population structure, Kinship.