Plant Production and Genetics **تولید و ژنتیک گیاهی**
Vol. 5, No. 2, Autumn & Winter 2024, p. 201-210 **جلد ۵، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۳، صفحه ۲۱۰-۲۰۱**
DOI: 10.22034/plant.2024.141546.1111 مقاله پژوهشی

استفاده از تلاقی برگشتی به کمک نشانگر برای انتقال ژن‌های مقاومت به زنگ نواری به ارقام گندم ایرانی

حنانه میراحمدی[۱]، فاطمه باقرزاده[۱]، ثریا پورتبریزی[*۲]، علی کاظمی پور[۳]، مریم درانی‌نژاد[۲]، روح اله عبدالشاهی[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۲. دانش آموخته دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۳. استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۴. دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۱۲

چکیده

زنگ نواری (زرد)، با عامل قارچی *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم در اغلب نقاط دنیا به حساب می‌آید. کاربرد هرساله و بی‌رویه قارچ‌کش در کنار چالش آلایندگی می‌تواند مقاومت قارچ‌های بیماریزا به قارچ‌کش را نیز در پی داشته باشد. بنابراین، ایجاد مقاومت ژنتیکی مطلوب‌ترین راهکار مقابله با این بیماری است. ایجاد ارقام جدید برای جایگزینی ارقام حساس رایج نیز بسیار زمان‌بر است. بنابراین انتقال ژن‌های مقاومت به بیماری به ارقام رایج سریع ترین روش برای ایجاد ارقام مقاوم است. در این پژوهش ژن‌های *Yr18* و *Yr29* که مؤثرترین ژن‌های مقاومت گیاه کامل هستند، با استفاده از روش تلاقی برگشتی به‌کمک نشانگر به ارقام ایرانی بهاران، رخشان، پارسی و امین منتقل شدند. چهار پروژه به‌نژادی جداگانه برای انتقال این ژن‌ها به ارقام یاد شده انجام شد. هر رقم با والدهای بخشنده Lalbahadur/Pavon و Opata85 تلاقی داده شد. نتاج حاصل با ارقام ایرانی (والدهای تکراری) تلاقی برگشتی داده شدند. با ژنوتیپ‌یابی ۳۰ بوته تصادفی از نتاج BC_1F_1 در هر پروژه، ژنوتیپ‌های هتروزیگوت حامل ژن مقاومت با استفاده از نشانگر اختصاصی مشخص شد. سپس تلاقی برگشتی دوم با استفاده از ژنوتیپ‌های هتروزیگوت منتخب هر نشانگر صورت گرفت. در هر جمعیت لاین مقاوم در برابر زنگ نواری را می‌توان با تکرار چند نسل تلاقی برگشتی و یک نسل خودگشنی، ایجاد کرد.

کلیدواژگان: زنگ زرد، گندم نان، مقاومت پایدار، مقاومت گیاه کامل، نشانگر اختصاصی

[*]ایمیل نویسنده مسئول: s.pourtabrizi@empl.uok.ac.ir

مقدمه

زنگ نواری با عامل *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های برگی گندم با دامنه گسترش وسیع، همواره تولید این محصول راهبردی را تهدید کرده است و به طور متوسط منجر به کاهش عملکرد بین ۱۰ تا ۷۰ درصد شده است (Chen, 2005). اگرچه تمام زنگ‌ها، شامل زنگ سیاه، قهوه‌ای و نواری از لحاظ اقتصادی جزو بیماری‌های مهم غلات هستند، اما میزان خسارت آنها بر اساس کاهش عملکرد دانه متفاوت است. عامل بیماری زنگ نواری با آسیب رساندن به سیستم تنفسی و از بین بردن قسمت‌های برگی گیاه علاوه بر کاهش کیفیت دانه، موجب کاهش شدید عملکرد دانه می‌شود (Chen, 2005; Line, 2002). تحلیل میزان بروز بیماری و میزان تلفات محصول در مناطق عمده کشت گندم جهان، نشان داده است که قارچ عامل بیماری زنگ نواری جدی‌ترین تهدید زیستی برای تولید پایدار و بین‌المللی گندم است (Wellings, 2011). نتایج گسترده‌ای در مورد اساس ژنتیکی این مقاومت را در مطالعات (Chen, 2005) و (Wellings *et al.*, 2012) می‌توان یافت. تاکنون علاوه بر ژن‌های در حال مطالعه، بیش از ۵۴ ژن اصلی مقاومت به زنگ نواری شناسایی شده است و در برنامه‌های به‌نژادی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Basnet *et al.*, 2013). که بخش عمده آنها از ژنوتیپ‌های محلی گندم هگزاپلوئید به‌دست آمده‌اند (McIntosh *et al.*, 1995).

این موضوع نشان دهنده اهمیت ذخایر ژنتیک به عنوان منبع مقاومت به این بیماری است. کاربرد هرساله و بی رویه قارچ‌کش در کنار چالش آلایندگی می‌تواند مقاومت قارچ‌های بیماریزا به قارچ‌کش را نیز درپی داشته باشد (Naseri *et al.*, 2021). با مشکلاتی که در جایگزینی سریع ارقام حساس گندم وجود دارد، اصلاح ارقام با سطوح مناسب مقاومت ژنتیکی، کارآمدترین روش برای کنترل زنگ نواری، به عنوان راهبرد بلند مدت محسوب می‌شود.

دو دسته مقاومت نژاد اختصاصی (مقاومت در مرحله گیاهچه) و مقاومت نژاد غیراختصاصی (مقاومت در مرحله گیاه کامل) در برابر زنگ نواری وجود دارد. مقاومت نژاد اختصاصی به دلیل ایجاد نژاد جدید پاتوژن، به‌طور معمول، طول عمر کوتاهی دارد و شکسته می‌شود (Huerta-Espino *et al.*, 2011; Wellings, 2011; Huerta-Espino *et al.*, 2020). اما گیاهان حامل ژن‌های مقاومت نژاد غیراختصاصی یا همان مقاومت در مرحله گیاه کامل، در مرحله گیاهچه‌ای حساس، ولی در مرحله گیاه کامل مقاومت نسبی دارند. این نوع مقاومت توسط ژن‌هایی با اثر کم تا متوسط کنترل می‌شود (Lagudah, 2011). بنابراین، وقتی چندین ژن مقاومت در مرحله گیاه کامل در یک رقم جمع شوند سطح بالایی از مقاومت (شبیه به مصونیت) را ایجاد می‌کنند (Huerta-Espino *et al.*, 2020).

چندین ژن، از جمله *Yr*16، *Yr*18، *Yr*29، *Yr*30، *Yr*39 و *Yr*52، مقاومت کامل یا غیراختصاصی را نسبت به زنگ نواری در گیاه ایجاد می‌کنند (Morgounov *et al.*, 2012). در حال حاضر، یکی از چالش‌های عمده به‌نژادگران گندم، تجمیع ژن‌های اصلی برای دوام مقاومت در برابر زنگ با استفاده از انتخاب به کمک نشانگر است. تاکنون، هشت ژن (*Lr*34/*Yr*18، *Lr*46/*Yr*29، *Lr*67/*Yr*46، *Lr*68، *Lr*74، *Lr*75، *Lr*77، و *Lr*78) که در برابر چندین پاتوتیپ قارچی مقاومت ایجاد می‌کنند، در خزانه ژنی گندم شناسایی شده‌اند و نشانگرهای مولکولی پیوسته با آنها هم‌چون *Xwmc44*، *Xgwm259*، *Xbarc80*، csLV34، Cssfr و ... توسعه داده شده‌اند (Singh *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2013; Herrera-Foessel *et al.*, 2014; Bobrowska *et al.*, 2022).

مهم‌ترین ژن‌های این دسته که به گروه مقاومت تدریجی یا مقاومت کامل تعلق دارند ژن‌های *Lr*34/*Yr*18/*Sr*57/*Ltn*1، *Lr*46/*Yr*29/*Sr*58/*Ltn*2 و *Lr*67/*Yr*46//*Sr*55/*Ltn*3 هستند که مقاومت نسبی در مقابل بیماری‌های زنگ قهوه‌ای (*Lr*)، زنگ نواری (*Yr*) و زنگ سیاه(*Sr*) نشان می‌دهند (William *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2011; Herrera-Foessel *et al.*, 2014). ژن *Yr*18 در گندم دارای اهمیت است، زیرا مقاومت غیراختصاصی و پایدار را در برابر زنگ نواری ایجاد می‌کند و بیش از ۱۰۰ سال است که به کار گرفته شده است (Kolmer *et al.*, 2008). طول توالی نوکلئوتیدی *Yr*18 شامل ۱۱۸۰۵جفت باز می‌باشد، از ۲۴ اگزون تشکیل شده است و بر روی کروموزوم 7DS گندم قرار دارد. علاوه بر این باعث بیان ژن ایجاد کننده نکروز نوک برگ (LTN) در برگ‌های پرچم گیاه بالغ می‌شود (Krattinger *et al.*, 2009).

مطالعات نشان داده است که وجود یا عدم وجود ژن *Yr*18 نقش کلیدی در مقاومت پایدار گندم در برابر پاتوژن دارد. استفاده از نشانگرهای اپیدمیولوژیک، فنوتیپی و ژنوتیپی

وابسته، برای درک بهتر رفتار مقاومت ژنوتیپ‌های گندم در برابر آلودگی ایجاد شده توسط زنگ نواری ثابت کرده است که تعیین میزان مقاومت گیاه بالغ، یک گام مهم برای ارائه دستورالعمل‌ها و توصیه‌های پیشگیرانه و کنترل کننده جهت به حداقل رساندن تلفات ناشی از این بیماری است. علاوه بر این، می‌توان از آن برای توسعه ارقام جدید گندم مقاوم نیز استفاده کرد.(Omar *et al.*, 2021).

ژن *Yr*29 که به صورت *Yr*29/*Lr*46/*Sr*58 نشان داده می‌شود، علاوه بر ایجاد مقاومت به زنگ زرد، باعث مقاومت به زنگ قهوه‌ای (*Lr*46) و زنگ سیاه (*Sr*58) می‌شود (William *et al.*, 2003). دومین ژنی است که در مقاومت غیراختصاصی در برابر زنگ نواری در گندم نقش دارد و اولین بار در رقم Pavon 76 گزارش شد (Singh *et al.*, 1998; Kolmer *et al.*, 2015). چندین نشانگر مولکولی برای شناسایی *Yr*29/*Lr*46 شناسایی شده است. نشانگر ریزماهواره *Xbarc80* که با فاصله ۱۰ تا ۱۱ سانتی‌مورگان از نشانگر Xgwm259 قرار دارد، به عنوان نشانگر جایگزین توصیه می‌شود (Lowe *et al.*, 2011; Skowrońska *et al.*, 2020).

انتخاب به کمک نشانگر به عنوان یک ایده انقلابی نشان داد که به‌نژادگران می‌توانند مستقیماً روی آلل‌ها، بدون دخالت فنوتیپ، انتخاب کنند (Gupta *et al.*, 2010). اگرچه هرگز جایگزین فنوتیپ و روش‌های انتخاب مرسوم نشد، اما در حال حاضر نقش مهمی در اینتروگرسیون از طریق تلاقی برگشتی، هرمی ساختن ژن و توسعه لاین‌ها در به‌نژادی گندم ایفا می‌کند. استفاده از نشانگرهای مولکولی برای انتخاب ژنوتیپ‌های برتر در برنامه‌های به نژادی، برای صفاتی که از نظر فنوتیپی گزینش آنها دشوار، در معرض خطای محیطی بالا و یا ارزیابی آنها پرهزینه است، بسیار سودمند است (Koebner *et al.*, 2003). یکی دیگر از مزایای انتخاب به کمک نشانگر این است که می‌توان آن را بر روی DNA استخراج شده از بافت برگ بکار گرفت و در نتیجه، یک جایگزین غیر مخرب و مستقل از مقدار بذر، برای گزینش‌های فنوتیپی فراهم می‌کند. انتخاب مبتنی بر نشانگر این امکان را می‌دهد که در هر زمان از یک برنامه به‌نژادی، مورد استفاده قرار گیرد. مزیت‌های استفاده از این روش در به‌نژادی توسط پژوهشگران زیادی مطالعه شده است (Bonnett *et al.*, 2005; Frisch *et al.*, 2014). ثابت شده است زمانی که از انتخاب به کمک نشانگر در تلاقی برگشتی استفاده می‌شود، بازده ژنتیکی نسبت به گزینش فنوتیپی بیشتر بوده است. این راهکار، که به عنوان تلاقی برگشتی به کمک نشانگر شناخته می‌شود، کارایی آلل‌هایی در تلاقی برگشتی را که مغلوب، اپیستاتیک یا تأثیرگذار هستند، ولی نمی‌توان آنها را به راحتی بر روی یک گیاه واحد اندازه‌گیری کرد، بسیار بهبود بخشید. نشان داده شده است که تلاقی برگشتی به کمک نشانگر منجر به افزایش بازدهی حدود دو نسل برای بازیابی ژنوم والد تکراری در مقایسه با تلاقی برگشتی معمولی بدون استفاده از نشانگرها شد. علاوه براین با پیشرفت نسل‌ها، بخش زیادی از ژنوم والد تکراری بازیابی می‌شود و بنابراین بخش‌های کمی از ژنوم والدین بخشنده باقی می‌ماند (Hospital *et al.*, 1997; Rutkoski *et al.*, 2022).

چالش پیش‌رو، راهبردهای جدید انتخاب به کمک نشانگر در مسیر به‌نژادی گیاهان است. در این بین هرمی کردن ژن‌ها، چشم‌انداز روشن‌تری برای دستیابی به مقاومت پایدار در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارد. اگرچه این راهکار طولانی و هزینه‌بر است اما هرمی سازی مبتنی بر انتخاب توسط نشانگر می‌تواند هرمی شدن ژن‌ها را بطور موثر در یک زمینه ژنتیکی تسهیل کند (Jashi *et al.*, 2010). هرمی کردن ژن‌های مقاومت *Yr*5 و *Yr*15 نشان می‌دهد که هرمی کردن ژن‌های مقاومت در مرحله گیاه کامل نیز از این قاعده مستثنی نیست(Santra *et al.*, 2006). هرمی کردن ژن‌های مقاومت در گیاه کامل باعث نیز ایجاد مقاومت پایدار می‌شود. مطالعات نشان داده است که در یک جمعیت متنوع با منشأ سیمیت ژنوتیپ‌های حاوی ژن‌های مقاومت در مرحله گیاه کاملبه طور معنی‌دار، عملکرد بیشتری نسبت به ژنوتیپ‌های حامل ژن‌های مقاومت در مرحله گیاهچه‌ای دارند (Msundi *et al.*, 2021).

در راستای هدف نهایی، یعنی هرمی کردن ژن‌های مقاومت غیر اختصاصی *Yr*18 و *Yr*29، در این بخش از پژوهش، انتقال ژن‌های مقاومت *Yr*18 و *Yr*29 نسبت به زنگ نواری که در مرحله گیاه کامل، مقاومت ایجاد می‌کنند، از لاین‌های استاندارد Lalbahadur/Pavon و 85 Opata به ارقام بهاران، رخشان، امین و پارسی با استفاده از روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگر صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شهید باهنر کرمان با مختصات ۳۰/۲۸ درجه عرض جغرافیایی و ۵۷/۰۳ درجه طول جغرافیایی انجام شد. کاشت بذور والدین مقاوم به عنوان والد بخشنده (لاین‌های استاندارد Lalbahadur/Pavon و Opata 85) و ارقام بهاران، رخشان، امین و پارسی به عنوان والدین گیرنده (تکراری)، به صورت دستی در چهار پروژه بەنژادی تلاقی برگشتی به کمک نشانگر مجزا انجام شد. فاصله بین ردیف‌ها ۴۰ سانتی‌متر و فاصله روی ردیف‌ها ۲۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. بذور به صورت خطی در عمق ۵-۴ سانتی‌متری قرار گرفت. عملیات دورگ‌گیری در طول پروژه شامل انتخاب پایه مادری مناسب، اخته نمودن سنبله مادری، آماده نمودن پایه پدری جهت گرده‌افشانی و گرده‌افشانی بود.

رقم بهاران مناسب کشت در مناطق معتدلِ مواجه با تنش رطوبتی آخر فصل و مقاوم به خوابیدگی است. رخشان که برای کاشت در مناطق معتدل کشور توصیه می‌شود، با سازگاری در برابر قطع آب آخرفصل، می‌تواند به تولید و صرفه‌جویی در میزان آب مصرفی کمک کند. رقم پارسی و امین هم با کیفیت نانوایی خوب، برای کشت در مزارع آبی مناطق معتدل ایران پیشنهاد شده‌اند. همه این ارقام برخلاف خصوصیات مثبت، پتانسیل مقاومت مطلوب در برابر زنگ را ندارند.

دو ژن مقاومت در مرحله گیاه کامل (*Yr*18 , *Yr*29) از لاین‌های استاندارد Lalbahadur/Pavon و Opata 85 در این چهار پروژه بەنژادی مجزا به ارقام بهاران، رخشان، امین و پارسی با استفاده از روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگر منتقل شدند (جدول۱).

جدول۱- ایجاد نسل BC_2F_1 حامل ژن‌های *Yr*18 , *Yr*29. والدهای بخشنده لاین‌های استاندارد Lalbahadur/Pavon و Opata 85 و والدهای تکراری ارقام بهاران، رخشان، امین و پارسی هستند.

توضیحات	تلاقی	سال
تلاقی	والدین تکراری × والدین بخشنده	۱۴۰۱
تلاقی برگشتی اول	والدین تکراری × F_1	۱۴۰۲
گزینش به کمک نشانگر و تلاقی برگشتی دوم	والدین تکراری×BC_1F_1	۱۴۰۳

برای انتقال ژن‌های *Yr*18 , *Yr*29، ده بوته از هریک از ارقام بهاران، رخشان، امین و پارسی با لاین‌های استاندارد Lalbahadur/Pavon و Opata 85 (که به ترتیب دارای ژن مقاومت *Yr*18و *Yr*29 هستند) تلاقی داده شدند تا نتاج F_1 حاصل شود (در این نسل سهم ژنتیکی والدین تکراری ۵۰ درصد است). سپس تمامی بذور F_1 (۱۰۰ بذر حاصل از کل تلاقی هر رقم با لاین‌های استاندارد) حاصل در مزرعه کشت و تلاقی با والدین تکراری برای رسیدن به نسل BC_1F_1 انجام شد (در این نسل سهم ژنتیکی والدین تکراری۷۵ درصد است). جهت انتخاب بوته‌های هتروزایگوت به کمک نشانگر، در هر یک از جمعیت‌های حاصل از تلاقی برگشتی اول که بین لاین‌های استاندارد Lalbahadur/Pavon وOpata 85 و ارقام بهاران، رخشان، امین و پارسی انجام شد، ۳۰ بوته به تصادف شماره‌گذاری و نمونه‌های برگی از این بوته‌ها تهیه و استخراج DNA با استفاده از روش ژانگ انجام شد(Zhang *et al.*, 1998). کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با روش‌های اسپکتروفتومتری (Epoch-BioTek) و الکتروفورز روی ژل آگارز ارزیابی شد. برای بررسی حضور یا عدم حضور ژن *Yr*18 از نشانگر مولکولی csLV34 استفاده شد. استفاده از این نشانگر که ۰.۴ سانتی مورگان با *Lr*34 فاصله دارد، در بسیاری از لاین‌ها و ارقام حاصل از برنامه‌های بەنژادی مختلف در سراسر جهان تأیید شده است. هم بارز بودن این نشانگر و تولید باندهای واضح و قابل نمره دهی، به اضافه سهولت کار با آن به دلیل تفاوت ۸۰ بازی اندازه آلل‌های پیوسته با مقاومت و آلل حساسیت از دلایل محبوبیت این نشانگر در ارزیابی می‌باشد. آلل پیوسته با مقاومت در این نشانگر با اندازه ۱۵۰جفت باز و و آلل حساسیت با اندازه ۲۲۹ جفت باز روی ژل آگارز مشاهده می شوند (Lagudah *et al.*, 2006). نشانگر مولکولی برای

شناسایی ژن *Yr*29 با آغازگری به نام BARC80 تکثیر شد. این نشانگر که یک ریزماهواره است در فاصله ۱۰-۱۱ سانتی مورگان با نشانگر *Xgwm259* نقشه‌یابی شده است و می‌تواند به عنوان یک نشانگر جایگزین استفاده شود. آلل پیوسته با مقاومت در این نشانگر با اندازه ۱۱۰جفت باز و آلل حساسیت با اندازه ۹۵ جفت باز تکثیر می‌گردند (Lowe *et al.*, 2011). توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ و دمای اتصال آن در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در جدول ۲ نشان داده شده است. برای تکثیر آلل‌های مقاومت یا حساسیت واکنش زنجیره‌ای تکثیر دی ان ای در دستگاه گرادیان (Biometra Tone, Analytik Jena, Germany) انجام شد. کلیه آزمایشات مولکولی در طول پروژه جهت اطمینان از تکرارپذیری، دو بار تکرار شدند.

جدول ۲- توالی آغازگرها برای ژن‌های *Yr18*و *Yr29*

ژن	نوع مقاومت	نشانگر	توالی آغازگر	منبع
*Yr*18	مقاومت گیاه کامل	csLV34	F: GTTGGTTAAGACTGGTGATGG R: TGCTTGCTATTGCTGAATAGT	(Lagudah *et al*., 2006)
*Yr*29	مقاومت گیاه کامل	Xbarc80	F: GCGAATTAGCATCTGCATCTGTTTGAG R: CGGTCAACCAACTACTGCACAAC	(Lowe *et al*., 2011)

جدول ۳- دما و زمان مراحل مختلف واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

ژن	زمان (C°) دما	واسرشت سازی اولیه	واسرشت سازی	اتصال آغازگر	بسط	بسط نهایی
*Yr*18	دما(°C)	۹۴	۹۴	۵۳	۷۲	۷۲
	زمان	۲ دقیقه	۳۰ ثانیه	۳۰ ثانیه	۳۰ ثانیه	۴۵ ثانیه
*Yr*29	دما(°C)	۹۴	۹۴	۵۹.۹	۷۲	۷۲
	زمان	۳ دقیقه	۳۰ ثانیه	۳۰ ثانیه	۳۰ ثانیه	۴۵ ثانیه

تعـداد سیکل‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای این ژن‌ها به ترتیب ۳۸ و ۳۶ بود. در ادامه محصولات بدست آمده روی ژل آگارز ۳ درصد با استفاده از بافر TBE:0.5x جدا سازی و با رنگ ایمن DNA Green Viewer رنگ‌آمیزی و با اشعه ماورابنفش در دستگاه عکسبرداری از ژل (Gel Doc, Vilber, Quantum 4) مشاهده شدند.

با ژنوتیپ‌یابی ۳۰بوته تصادفی توسط نشانگر اختصاصی در هر یک از جمعیت‌های حاصل از تلاقی برگشتی اول، دو نـوع ژنوتیپ هموزیگوت حساس و هتروزیگوت دارای ژم مقاومت مشاهده شد. به این ترتیب که در جمعیت‌های تلاقی برگشتی اول برای ژن *Yr*18، ژنوتیپ دارای تک باند حساسیت در گروه هموزیگوت حساس و ژنوتیپ دارای دوباند حساسیت و مقاومت در گروه هتروزیگوت دارای ژن مقاومت قرار گرفت. در جمعیت‌های تلاقی برگشتی اول برای ژن *Yr*29 نیز همین نوع گروه بندی انجام شد. تلاقی بین تمام بوته‌های هتروزیگوت دارای هر یک از ژن‌های مقاومت *Yr*18 و *Yr*29 انتخاب شده و والدهای تکراری، برای دستیابی به نسل BC_2F_1 صورت گرفت (در این نسل سهم ژنتیکی والدین تکراری۵ /۸۷ درصد است).

نتایج و بحث

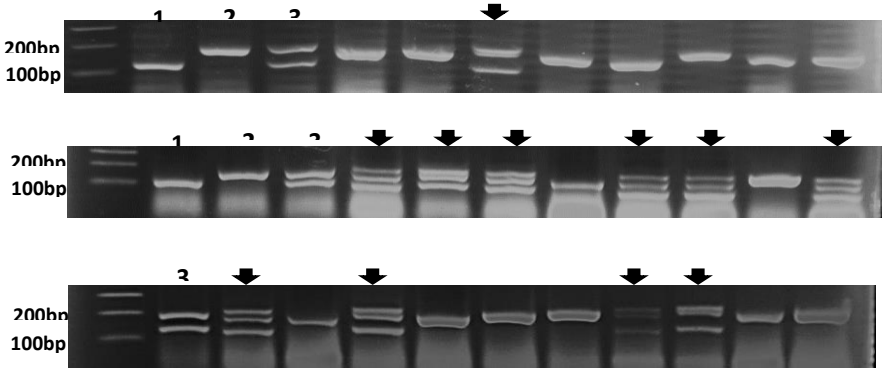
تلاقی برگشتی به کمک نشانگر ژن *Yr*18

این ژن که بصورت *Lr*34/*Yr*18/*Sr*57/*Ltn*1 نشان داده می‌شود (McIntosh *et al.*, 1995; Dyck *et al.*,1987) باعث ایجاد مقاومت تدریجی یا مقاومت در مرحله گیاه کامل می‌شود. مقاومت این ژن در برابر زنگ نواری، پایدار بوده است و برای چندین دهه موثر است. این ژن برای اولین بار در کانادا مشخص شد. اما ژرم پلاسم‌های حاوی *Lr*34 از

اوایل قرن بیستم استفاده شد (Dyck *et al.*, 1987). در این پژوهش، تکثیر باندی با طول ۱۵۰ جفت باز در رقم Lalbahadur/Pavon به عنوان والد بخشنده و باندی به طول **۲۲۹** جفت باز در ارقام بهاران، رخشان، امین و پارسی ، به ترتیب حضور آلل‌های مقاومت و حساسیت به زنگ نواری را تایید کرد. از این تنوع ژنتیکی در جهت گزینش و رسیدن به ژنوتیپ‌های هتروزیگوت حاصل از تلاقی برگشتی اول استفاده شد. همانطور که در شکل نشان داده شده است، نتاج هتروزیگوت (حامل ژن مقاومت) گزینش شدند. در تلاقی برگشتی اول در هر جمعیت، ۳۰ بوته به تصادف شماره گذاری و ژنوتیپ‌یابی شد.

شکل ۱ نتاج در حال تفرق نسل BC_1F_1 را نشان می‌دهد. آلل‌های مکان ژنی مرتبط با *Yr*18 داری دو باند با طول ۱۵۰ و ۲۲۹ جفت باز است که به ترتیب آلل‌های مقاومت و حساسیت به زنگ نواری را نشان می‌دهند (Lagudah *et al.*, 2006).

شکل ۱- نتاج در حال تفرق نسل BC1F1 را نشان می‌دهد. آلل‌های مکان ژنی مرتبط با Yr18 داری دو باند با طول ۱۵۰ و ۲۲۹ جفت باز است که به ترتیب آلل‌های مقاومت و حساسیت به زنگ نواری را نشان می‌دهند (Lagudah *et al.*, 2006).

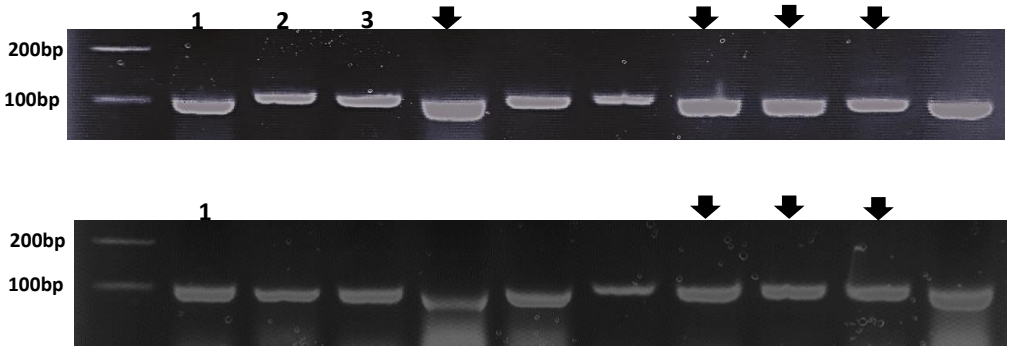


شکل ۱- شماره ۱ لاین استاندارد Lalbahadur/Pavon حامل دارای آلل مقاومت ژن *Yr*18 و شماره ۲ یکی از ارقام دارای آلل حساسیت را نشان می‌دهد. شماره ۳ ترکیب محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز دو والد مقاوم و حساس برای ایجاد ترکیب هتروزیگوت کاذب و اطمینان از گزینش نتاج هتروزیگوت حقیقی است. سایر ستون‌ها نتاج حاصل از تلاقی برگشتی اول را نشان می‌دهند. نتاج گزینش شده برای ژن *Yr*18 با فلش نشان داده شده‌اند (برخی از نتاج آورده شده است).

تلاقی برگشتی به کمک نشانگر ژن *Yr*29

این ژن نیز علاوه بر مقاومت به زنگ نواری، باعث ایجاد مقاومت به زنگ قهوه‌ای (*Lr* 64) و زنگ سیاه (*Sr*58) می‌شود و به صورت *Sr*58/*Yr*29/*Lr*64 نشان داده می‌شود. اولین بار در رقم Pavon76 گزارش شد (Singh *et al.*, 2011). روی کروموزموم 1B قرار دارد و باعث مقاومت تدریجی می‌شود (William *et al.*, 2003).

در این پژوهش، تکثیر باندی با طول ۱۱۰ جفت باز در رقم Opata85 به عنوان والد بخشنده و باندی به طول ۹۵ جفت باز در ارقام بهاران، رخشان، امین و پارسی ، به ترتیب حضور آلل‌های مقاومت و حساسیت به زنگ نواری را تایید کرد (Lagudah *et al.*, 2006). از این تنوع ژنتیکی در جهت گزینش و رسیدن به ژنوتیپ‌های هتروزیگوت در تلاقی‌های برگشتی مورد نظر استفاده شد. شکل ۲ نتاج در حال تفرق این ژن را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است، نتاج هتروزیگوت (حامل ژن مقاومت) گزینش شدند. در هر جمعیت حاصل از تلاقی برگشتی اول ۳۰ بوته ژنوتیپ‌یابی شد.



شکل۲- شماره ۱ ترکیب محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز دو والد مقاوم Opata 85 و یکی از ارقام حساس برای ایجاد ترکیب هتروزیگوت کاذب و اطمینان از گزینش نتاج هتروزیگوت حقیقی است. شماره ۲ لاین استاندارد Opata 85 دارای آلل مقاومت ژن *Yr29* و شماره ۳ یکی از ارقام دارای آلل حساسیت را نشان می‌دهد.. سایر ستون‌ها نتاج حاصل از تلاقی برگشتی اول را نشان می‌دهند. نتاج گزینش شده برای ژن *Yr29* با فلش نشان داده شده‌اند (برخی از نتاج آورده شده است).

ژن‌های *Yr*18/*Lr*34/*Pm*38/*Sr*57 و *Yr*29/*Lr*46/*Sr*58 علاوه بر ایجاد مقاومت در مرحله گیاه کامل، با اثر پلیوتروپیک، به چند پاتوژن مقاومت نشان می‌دهند. ژن *Yr*18 با فاصله کمی از ژن نکروزه شدن نوک برگ (LTN) قرار دارد. همین‌طور، ممکن است نکروزه شدن نوک برگ به خاطر اثر پلیوتروپیک ژن *Yr*18 باشد و در دنیا به عنوان عامل مقاومت پایدار در برنامه‌های به‌نژادی استفاده می‌شود.

*Yr*29/*Lr*46/*Sr*58دومین ژنی است که در مقاومت در مرحله گیاه کامل در برابر زنگ نواری در گندم نقش دارد (Kolmer *et al.*, 2015). در گیاهان بالغ اثر *Yr29* مشابه *Yr18* اما کوچکتراست. با استفاده از ترکیب به‌نژادی کلاسیک و تلاقی برگشتی به‌کمک نشانگر می‌توان انتقال ژن‌های مقاومت به زنگ زرد را به ارقام تجاری و یا لاین‌های برتر گندم نان سرعت بخشید (Martinez *et al.*, 2001). به دلیل اهمیت بالای این دو ژن در اعطای مقاومت پایدار، در گام اول با استفاده از روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگر در برنامه‌های به‌نژادی جداگانه‌ای به ارقام بهاران، رخشان، امین و پارسی منتقل شدند. در گام بعدی و با پیشرفت نسل، برای ایجاد مقاومت پایدار، هرمی کردن ژن‌های مقاومت غیراختصاصی ضمن استفاده از نشانگرهای ملکولی بسیار مفید است (Fuchs *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Beddow *et al.*, 2015)

انتقال ژن‌های مقاومت به زنگ زرد به این ارقام جلوی کاهش عملکرد به خاطر شیوع زنگ زرد را خواهد گرفت. انتقال ژن‌های مقاومت به زنگ زرد نه تنها از لحاظ اقتصادی (حذف مبارزه شیمیایی بر علیه این بیماری)، بلکه از لحاظ سلامت انسان‌ها و حفاظت از محیط زیست دارای اهمیت زیادی است.

نتیجه گیری کلی

رقم بهاران مناسب کشت در مناطق معتدلِ مواجه با تنش رطوبتی آخر فصل و مقاوم به خوابیدگی است. رخشان که برای کاشت در مناطق معتدل کشور توصیه می‌شود، با سازگاری در برابر قطع آب آخرفصل، می‌تواند به تولید و صرفه‌جویی در میزان آب مصرفی کمک کند. رقم پارسی و امین هم با کیفیت نانوایی خوب، برای کشت در مزارع آبی مناطق معتدل ایران پیشنهاد شده‌اند. همه این ارقام برخلاف خصوصیات مثبت، پتانسیل مقاومت مطلوب در برابر زنگ را ندارند. به دلیل اهمیت بالای این ژن‌ها در اعطای مقاومت پایدار، در برنامه‌های به‌نژادی جداگانه‌ای به ارقام بهاران، رخشان، امین و پارسی منتقل شدند. برای ایجاد مقاومت پایدار، هرمی کردن ژن‌های

مقاومت اختصاصی و غیراختصاصی می‌تواند راهکار مناسبی باشد و در این راه اســتفاده از نشـانگرهای ملکولی بسیار مفید است. انتظار می‌رود در آینده با هرمی کردن ژن‌های *Yr*18 و *Yr*29 در این ارقام، مقاومت پایداری حاصل گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشـاورزی ایران (ABRII) به خـاطر حمایـت مالی این تحقیق و از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر به خاطر در اختیار قرار دادن بذور والدهای Opata 85 و Lalbahadur/Pavon سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

Basnet, B. R, Singh, R. P., Ibrahim, A.M. H., Herrera -Foessel, S. A., Huerta –Espino, J., Lan, C., & Rudd, J. C. (2013). Characterization of *Yr*54 and other genes associated with adult plant resistance to yellow rust and leaf rust in common wheat Quaiu 3. *Molecular Breeding*, *33*, 385 -399.

Bobrowska, R., Noweiska, A., Spychała, J., Tomkowiak, A., Nawracała, J., & Kwiatek, M. (2022). Diagnostic accuracy of genetic markers for identification of the *Lr46/Yr29* "slow rusting" locus in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biomolecular Concepts*, *13*(1), 1-9.

Bonnett, D., Rebetzke, G., & Spielmeyer, W. (2005). Strategies for efficient implementation of molecular markers in wheat breeding. *Mol Breeding*, *15*, 75–85

Chen, X. M. (2005). Epidemiology and control of stripe rust on wheat (*Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*) on wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *27*, 314-337.

Datta, D., Nayar, S. K., Prashar, M., & Bhardwaj, S. C. (2008). Inheritance of temperature-sensitive leaf rust resistance and adult plant stripe rust resistance in common wheat cultivar PBW343. *Euphytica*, *166*, 277–282.

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.

Frisch, M., Bohn, M., & Melchinger, A. E. (1999). Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. *Crop Science*, *39*(5), 1295-1301.

Gupta, P.K., Kumar, J., Mir, R. R., & Kumar, A. (2010). 4 Marker-assisted selection as a component of conventional plant breeding. *Plant breeding reviews*, *33*, 145.

Herrera-Foessel, S. A., Singh, R. P., Lillemo, M., Huerta-Espino, J., Bhavani, S., Singh, S., & Lagudah, E. S. (2014). Lr67/Yr46 confers adult plant resistance to stem rust and powdery mildew in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, *127*, 781– 789.

Hospital, F., & Charcosset, A. (1997). Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. *Genetics*, *147*:1469–1485.

Huerta-Espino, J., Singh, R., Crespo-Herrera, L. A., Villaseñor-Mir, H. E., Rodriguez-Garcia, M. F., Dreisigacker S., Barcenas-Santana, D., & Lagudah, E. (2020). Adult Plant Slow Rusting Genes Confer High Levels of Resistance to Rusts in Bread Wheat Cultivars from Mexico. *Frontiers in Plant Science*, *11*:824.

Huerta-Espino, J., Singh, R. P., German, S., McCallum, B. D., Park, R. F., & Chen, W.Q. (2011). Global status of wheat leaf rust caused by Puccinia triticina. *Euphytica*, *179*, 143–160.

Koebner, R. M., & Summers, R. W. (2003). 21st century wheat breeding: plot selection or plate detection? *TRENDS in Biotechnology*, *21*(2), 59-63.

Kolmer, J. A., Bernardo, A., Bai, G., Hayden, M. J., & Chao, S. (2018). Adult plant leaf rust resistance derived from Toropi wheat is conditioned by *Lr*78 and three minor QTL. *Phytopathology*, *108*(2), 246-253.

Kolmer, J. A., Singh, R. P., Garvin, D. F., Viccars, L., William, H. M., Huerta-Espino, J., & Lagudah, E.S. (2008). Analysis of the *Lr34*/*Yr18* Rust Resistance Region in Wheat Germplasm. *Crop science*, *48*, 1841–1852.

Krattinger, S. G., Lagudah, E. S., Spielmeyer, W., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., & Keller, B. (2009). A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science*, *323*(5919), 1360-1363.

Lagudah, E. S., McFadden, H., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Bariana, H. S., & Spielmeyer, W. (2006). Molecular genetic characterization of the *Lr*34/*Yr*18 slow rusting resistance gene region in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, *114*, 21-30.

Lagudah, E. S., Krattinger, S. G., Herrera -Foesse, S. A., Singh, R. P., Huerta -Espino, J., Spielmeyer, W., Brown -Guedira, G., Selter, L. L., & Keller, B. (2009). Gene -specific markers for the wheat gene *Lr*34/*Yr*18/*Pm*38 which confers resistance to multiple fungal pathogens. *Theoretical and Applied Genetics*, *119*, 889 –898

Line, R.F. (2002). Stripe rust of wheat and barley in North America: a retrospective historical review. *Annual Review of Phytopathology*, *40*, 75–118.

Lowe, I., Jankuloski, L., Chao, S., Chen, X., See, D., & Dubcovsky, J. (2011). Mapping and validation of QTL which confer partial resistance to broadly virulent post-2000 North American races of stripe rust in hexaploid wheat. *Theoretical and applied genetics*, *123*, 143– 157.

Martinez, F., Niks, R. E., Singh, R. P., & Rubiales, D. (2001). Characterization of Lr46, a gene conferring partial resistance to wheat leaf rust. *Hereditas*, *135*(2-3), 111-114.

McIntosh, R. A., Wellings, C. R., & Park, R. F. (1995). Wheat rusts: an atlas of resistance genes. *CSIRO publishing.Australia*, pp. 200.

Morgounov, A., Tufan, H. A., Sharma, R., Akin, B., Bagci, A., Braun, H. J., & McIntosh, R. (2012). Global incidence of wheat rusts and powdery mildew during 1969–2010 and durability of resistance of winter wheat variety Bezostaya 1. *European journal of plant pathology*, *132*, 323-340.

Msundi, E. A., Owuoche, J. O., & Oyoo, M. E. (2021). Identification of bread wheat genotypes with superior grain yield and agronomic traits through evaluation under rust epiphytotic conditions in Kenya. *Scientific Reports*, *11*, 21415.

Naseri, B., & Jalilian, F. (2021). Charactrization of leaf rust progress in wheat cultivars with different resistance levels and sowing dates. *European Journal of Plant Pathology*, *159*, 665-672.

Omar, G. E., Mazrou, Y. S., El-Kazzaz, M. K., Ghoniem, K. E., Ashmawy, M. A., Emeran, A. A., & Nehela, Y. (2021). Durability of Adult Plant Resistance Gene Yr18 in Partial Resistance Behavior of Wheat (Triticum aestivum) Genotypes with Different Degrees of Tolerance to Stripe Rust Disease, Caused by *Puccinia striiformis* f. sp. tritici: A Five-Year Study. *Plants*, *10*(11), 2262.

Rutkoski, J. E., Krause, M. R., & Sorrells, M. E. (2022). Breeding methods: population improvement and selection methods. in *wheat improvement: Food Security in a Changing Climate*, pp. 83-96. Cham: Springer International Publishing.

Santra, D., DeMacon, V. K., Garland-Campbell, K., & Kidwell, K. (2006). Marker assisted backcross breeding for simultaneous introgression of stripe rust resistance genes yr5 and yr15 into spring wheat (*Triticum aestivum* L.). In *Proceedings of the International Meeting of ASA-CSSA-SSSA, Salt Lake City, UT*, pp. 74-75.

Singh, R. P., Herrera-Foessel, S. A., Huerta-Espino, J., Lan, C. X., Basnet, B. R., Bhavani, S., & Lagudah, E. S. (2013). Pleiotropic gene *Lr*46/*Yr*29/*Pm*39/*Ltn*2 confers slow rusting, adult plant resistance to wheat stem rust fungus. In *Proceedings Borlaug Global Rust Initiative, 2013 Technical Workshop,* Vol. 17.

Singh, R. P., Herrera-Foessel, S. A., Huerta-Espino, J., Bariana, H., Bansal, U., McCallum, B., & Lagudah, E. S. (2012). *Lr*34/*Yr*18/*Sr*57/*Pm*38/*Bdv*1/*Ltn*1 confers slow rusting, adult plant resistance to *Puccinia graminis tritici*. In *13th Cereal Rust and Powdery Mildew Conference* p. 173. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press.

Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Bhavani, S., Herrera-Foessel, S. A., Singh, D., Singh, P. K., & Crossa, J. (2011). Race non-specific resistance to rust diseases in CIMMYT spring wheats. *Euphytica*, *179*, 175–186.

Skowrońska, R., Tomkowiak, A., Nawracała, J., & Kwiatek, M. T. (2020). Molecular identification of slow rusting resistance *Lr*46/*Yr*29 gene locus in selected (*Triticale* × *Triticosecale Wittmack*) cultivars. *Journal of Applied Genetics*, *61*(3), 359-366.

Wellings, C. R., Boyd, L. A., & Chen, X. M. (2012). Resistance to stripe rust in wheat: pathogen biology driving resistance breeding. In *Disease resistance in wheat* pp. 63-83. Wallingford UK: CABI.

Wellings, C. R. (2011). Global status of stripe rust: a review of historical and current threats. *Euphytica*, *179*(1), 129-141.

William, M., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Islas, S. O., & Hoisington, D. (2003). Molecular Marker Mapping of Leaf Rust Resistance Gene Lr46 and Its Association with Stripe Rust Resistance Gene *Yr*29 in Wheat. *Phytopathology*, *93*(2), 153-159.

Zhang, P., McIntosh, R. A., Hoxha, S., & Dong, C. (2009). Wheat stripe rust resistance genes Yr5 and Yr7 are allelic. *Theoretical and applied genetics*, *120*, 25-29.

Zhang, Y. P., Uyemoto, J., & Kirkpatrick, B. (1998). A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *JVirol Methods*, *71*, 45–50.

.

Plant Production and Genetics **تولید و ژنتیک گیاهی**

Vol. 5, No. 2, Autumn & Winter 2024, p. 201-210 **جلد ۵، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۳، صفحه ۲۱۰-۲۰۱**

Research Article DOI: 10.22034/plant.2024.141546.1111

Using marker-assisted backcrossing to transfer stripe rust resistance genes to Iranian wheat cultivars

Hannaneh Mirahmadi[1], Fatemeh Bagherzadeh[1], Soraya Pourtabrizi[*2], Ali Kazemipour[3], Maryam Dorrani-nejad[2], Rohullah Abdolshahi

1. MSc. student, Deparment of Plant Productin and Genetic.Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, iran
2. Ph.D. graduate, Deparment of Plant Productin and Genetic.Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, iran
3. Assistant Professor, Deparment of Plant Productin and Genetic.Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, iran
4. Associate Professor, Deparment of Plant Productin and Genetic.Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, iran

Received: 16-06-2024
Accepted: 02-08-2024

Abstract

Stripe (yellow) rust, caused by Puccinia striiformis f. sp. tritici (Pst), is one of the most important diseases of wheat in many parts of the world. The annual and indiscriminate use of fungicides not only increases pollution but can also lead to the resistance of pathogenic fungi to these chemicals. Therefore, creating genetic resistance is the best way to deal with this disease. Due to the challenges in quickly replacing susceptible wheat cultivars, breeding cultivars with suitable levels of genetic resistance is the most efficient method to control stripe rust as a long-term strategy. In this study, the Yr18 and Yr29 genes, which are among the most effective resistance genes in adult plants, were transferred to the Iranian cultivars Baharan, Rakhshan, Parsi, and Amin using the marker-assisted backcrossing method. For each cultivar, in four separate breeding projects, crosses were made with the donor parents Pavon/Lalbahadur and Opata85. The progeny of this generation (F1), containing 50% of the genetic material of their recurrent parent, were backcrossed with the Iranian cultivars (recurrent parent) to obtain BC1F1 progeny in each population. By genotyping 30 random plants in each project, the heterozygous genotypes carrying the resistance genes were identified using specific markers, and the second backcrossing was performed. In each population, a line resistant to yellow rust can be created by repeating several generations of backcrossing and one generation of selfing.

Keywords: Adult plant resistance, bread wheat, specific marker, stable resistance, yellow rust

Citation: Mirahmadi, H., Bagherzadeh, F., Pourtabrizi, S., Kazemipour, A., Dorrani-nejad, M., & Abdolshahi, R (2024). Using marker-assisted backcrossing to transfer stripe rust resistance genes to Iranian wheat cultivars. *Plant Production and Genetics*, 5(2), 201-210 https://doi.org/10.22034/plant.2024.141546.1111.

Copyrights:
Copyrights rights for this article is retained by the author (s), with publication rights granted to Plant Production and Genetics. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Corresponding Author Email: s.pourtabrizi@empl.uok.ac.ir