Crop Biotech.
Autumn (2018) 23: 57-78.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال هشتم، شماره بیست‌وسوم، پائیز ۱۳۹۷ (۷۸-۵۷)

شناسایی تنوع ارقام گندم سیستان از لحاظ ژن‌های مقاومت به عوامل بیماری‌های زنگ گندم با نشانگر ریز ماهواره

ملیحه شهرکی[۱]، عباسعلی امام‌جمعه[۲*]، براتعلی فاخری[۳]، بهمن فاضلی‌نسب[٤]
۱، ۲ و ۳. دانشجو، استادیار و استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل
٤. مربی، گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، پژوهشگاه دانشگاه زابل
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۱۱/۱٤- تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۸/۱۲)

Identification of genetic diversity between common Sistan wheat cultivars based on resistance genes to rust diseases by microsatellite marker

Maliheh Shahraki[1], Abbasali Emamjomeh[2*], Baratali Fakheri[3], Bahman Fazeli-Nasab[4]
1, 2, 3. M.Sc. Student, Professor, Assistant Professor, University of Zabol, Zabol, Iran.
4. Lecturer, Research Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.
(Received: Feb. 4, 2018 - Accepted: Nov. 3, 2018)

Abstract

To evaluate genetic diversity between Sistan common wheat cultivars, it was used 10 SSRs primers associated to stem, leaf and yellow rusts resistance genes. The lowest (3) and highest (7) allele number were generated by 12C, SCS719 and Xgdm116 primers and Xgwm443 primer, respectively (4.55 allele per each primer). The highest genetic diversity (0.39) and MI (2.29) was related to Xgdm116 and Xgwm533 primers, respectively; also, the lowest genetic diversity (0.1) and MI (0.33) was related to Xcfd36 primer. Xgdm36 primer showed the highest Ne, Shannon diversity and Nei diversity (1.45, 0.63 and 0.44, respectively); on the other hand, Xcfd36 primer the lowest Ne, Shannon diversity and Nei diversity (1.18, 0.19 and 0.11, respectively). The highest polymorphic bands between wheat cultivars were related to Arg. Arg and Aflak showed the least diversity for resistance to yellow rust and leaf rust, respectively. Also, Arg had the highest diversity for three types of rusts. The Xgdm116, Xwmc810 and SCS719 primers had more effect on identification of wheat cultivars. Finally, Arg cultivar can be recommended as a donor parent in wheat breeding programs for rust resistance. To gain the highest heterosis, it can be suggested hybridization between Arg and Hirmand cultivars.

Keywords: Wheat, Genetic diversity, Rust disease, Race, Resistance, SSRs marker, *Triticum aestivum*.

چکیده

در این پژوهش جهت بررسی تنوع ژنتیکی ارقام رایج گندم سیستان برای مقاومت به بیماری زنگ از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره‌ای پیوسته به ژن‌های مقاومت به بیماری زنگ‌های زرد، قهوه‌ای و سیاه استفاده شد. آغازگرهای 12C، SCS719 و Xgdm116 با ۳ آلل کمترین و آغازگر Xgwm443 با ۷ آلل، بیشترین آلل را داشتند. میانگین تعداد آلل در کل جایگاه‌ها برابر ٤/٥٥ بود. بیشترین شاخص چندشکلی (۰/۳۹) و شاخص نشانگری (۲/۲۹) به ترتیب مربوط به آغازگر Xgdm116 و Xgwm533 و کمترین میزان شاخص چندشکلی (۰/۱) و شاخص نشانگری (۰/۳۳) مربوط به آغازگر Xcfd36 بود. بیشترین تعداد آلل مؤثر، شاخص تنوع شانن و شاخص تنوع نی به ترتیب ۱/٤٥، ۰/٦۳، ۰/٤٤ متعلق به آغازگر Xgdm116 و کمترین میزان آلل مؤثر، شاخص تنوع شانن و شاخص تنوع نی به ترتیب ۱/۱۸، ۰/۱۹، ۰/۱۱ متعلق به آغازگر Xcfd36 بود. در بین ارقام گندم بیشترین درصد مکان چندشکلی، تعداد آلل مؤثر، شاخص تنوع نی و شاخص تنوع شانن به ترتیب ۳۹/٥۳، ۱/۲۷، ۰/۱٦ و ۰/۲۳ متعلق به رقم ارگ بود. تغییرات درون و بین ارقام با استفاده از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ٥٥ درصد کل تغییرات ژنتیکی درون ارقام وجود دارد. بیشترین و متنوع‌ترین ژن‌های مقاومت به زنگ از لحاظ مقاومت به بیماری زنگ زرد و قهوه‌ای به ترتیب، در رقم ارگ و رقم افلاک و نسبت به هر سه زنگ در رقم ارگ بود. آغازگرهای Xgdm116، Xwmc810 و SCS719 مؤثرترین آغازگرها در شناسایی و جداسازی ارقام مقاوم و حساس بودند. با توجه به اینکه رقم ارگ دارای بیشترین و متنوع‌ترین ژن‌های مقاومت بوده لذا پیشنهاد می‌گردد به‌عنوان یکی از پایه‌های پدری یا مادری در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: گندم، تنوع ژنتیکی، نشانگر ریزماهواره، بیماری زنگ، مقاومت، نژاد.

* نویسنده مسئول: عباسعلی امام‌جمعه
E-mail: aliimamjomeh@uoz.ac.ir

مقدمه

بیماری‌های گیاهی از جمله عوامل محدودکننده تولید در بسیاری از مناطق گندم خیز کشور می‌باشند. زنگ‌ها از مهم‌ترین بیماری‌های گندم در بسیاری از مناطق دنیا و از جمله ایران محسوب می‌شوند. در واقع هر جایی که گندم کشت می‌شود، بیماری زنگ نیز ممکن است وجود داشته باشد (Sharma *et al.*, 2016). قارچ‌های عامل بیماری زنگ در گندم سه گونه قارچ از جنس *Puccinia* هستند که شامل زنگ زرد[1] با عامل *Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *tritici* Eriks.، زنگ قهوه‌ای[2] با عامل *Puccinia triticina* Eriks.، و زنگ سیاه[3] با عامل *Puccinia graminis* Pers. F.sp. *tritici* Eriks. and Henn. هست (Stubbs, 1985; Mesterházy, 1989; Roelfs *et al.*, 1992; McIntosh *et al.*, 1995; Chen, 2005; Dubin & Brennan, 2009; Abbasi, 2013). در کشور ایران زنگ زرد از اهمیت بیشتری نسبت به زنگ سیاه و قهوه‌ای برخوردار بوده و در سال‌هایی که شرایط محیطی برای بروز همه‌گیری مناسب باشد سبب خسارت اقتصادی قابل توجهی روی ارقام حساس می‌شود.

تعداد ژن‌های اصلی مقاومت به زنگ زرد گزارش شده تا سال ۲۰۱۷، که عمدتاً ژن‌های مقاومت گیاهچه‌ای هستند، بیش از ۷۸ ژن مقاومت به زنگ زرد است (گیاهان حامل ژن‌های *Yr1*، *Yr3*، *Yr4*، *Yr5*، *Yr9*، *Yr10*، *Y15*، *Yr24*، *Yr32*، *YrSP*، *YrCV* مقاوم به زنگ زرد، گیاهان حامل ژن‌های *Yr2*، *Yr6*، *Yr7*، *Yr22*، *Yr23*، *Yr25*، *YrA* حساس به زنگ زرد). ضمناً مهم‌ترین آن‌ها *Yr1*، *Yr3*، *Yr4*، *Yr9*، *Yr7* و *Yr2* بوده و علاوه بر این ژن‌ها، ژن‌های دیگری به شکل ناشناخته وجود دارند که کار مطالعه بر روی آن‌ها همچنان ادامه دارد (Khan *et al.*, 2017; McIntosh *et al.*, 2017). هر چند احتمال می‌رود هر یک از ژن‌های مقاومت به زنگ زرد به تنهایی یا دو و یا چند تا از آن‌ها همزمان باهم وجود داشته باشند (Afshari, 2008). تاکنون ۷۷ ژن و چند واریانت مختلف از ژن‌های که مقاومت به زنگ قهوه‌ای (Lr) را ایجاد می‌کنند شناسایی و معرفی شده‌اند که از بین آن‌ها می‌توان به *Lr9*، *Lr19*، *Lr24*، *Lr25*، *Lr26*، *Lr28* و *Lr32* به‌عنوان مهم‌ترین ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای اشاره کرد (McIntosh *et al.*, 2017). از طرفی اگرچه بیش از ۵۹ ژن مقاومت مختلف در مقابل زنگ سیاه گندم گزارش شده است (مانند *Sr31*) که اکثرا آنها هم ژن‌های مقاومت گیاهچه‌ای می‌باشند ولی تا کنون تعداد محدودی از آن‌ها در ارقام تجاری مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Ziyaev *et al.*, 2011; McIntosh *et al.*, 2017).

بسیاری از نژادهای زنگ که در گذشته باعث خسارت می‌شده‌اند به دلیل استفاده از ارقام مقاوم و تنوع ژنتیکی از خسارت آنها جلوگیری و یا کاسته شده است. درعین‌حال نژادهای جدیدی از عوامل بیماری‌زا که در اثر جهش یا نوترکیبی غیرجنسی به‌وجود می‌آیند و قدرت بیماری‌زایی بالایی دارند نیازمند شناسایی و راهکارهای مؤثر جهت کنترل دارند. از این جهت، شناسایی ارقام مقاوم و حساس به زنگ و تمایز آنها در سطح ملکولی با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی که از نظر زمانی از سرعت بالایی برخوردار و سودمند هستند قابل توجه می‌باشند (Hallajian *et al.*, 2007; Shafie *et al.*, 2010). استفاده از نشانگرهای مولکولی یکی از ابزارهای بسیار مهم و قوی و مکمل در کنار روش‌های اصلاحی پایه (منظور مطالعات مزرعه‌ای و گلخانه‌ای اصلاحی) است و کاربردهای زیادی در ارزیابی روابط خویشاوندی ژنتیکی، انتخاب گیاهان برتر و بررسی شباهت یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف دارد (Fazeli-Nasab *et al.*, 2010; Pal *et al.*, 2015).

1. Yellow rust or stripe rust
2. Brown rust or leaf rust
3. Black rust or stem rust

روش‌های مختلفی به منظور بررسی ژن‌های مقاومت به زنگ‌ها و تعیین ژنوتیپ‌های مقاومت در ارقام گندم از طریق داده‌های تیپ آلودگی (Bhardwaj, 2017) و بررسی صحت نتایج به‌دست‌آمده به‌وسیله روش‌های ژنتیکی (نشانگرهای مولکولی) (Khan *et al.*, 2017) معرفی گردیده است. به طوریکه ابتدا استراتژی شناسایی ژن های مقاومت به زنگ قهوه‌ای با طراحی نشانگرهای RAPD (Autrique *et al.*, 1995)، AFLP و STS (Prins *et al.*, 2001b) و برای ژن‌های *Lr1*، *Lr9*، *Lr10*، *Lr13*، *Lr19*، *Lr24*، *Lr25*، *Lr27*، *Lr29*، *Lr31*، *Lr33*، *Lr34*، *Lr35*، *Lr37* و *Lr42* و SSR (McCartney *et al.*, 2004) آغاز گردید و حتی در طی برنامه شناسایی ژن مقاوم به زنگ قهوه‌ای Lr28، نشانگر SSRs، Xgwm160 معرفی گردید که در ارقام فاقد ژن *Lr28* باند ۱۹۶ بازی و در ارقام دارای ژن *Lr28* در ناحیه مورد نظر باندی آشکار نشد (Vikal *et al.*, 2004).

در تحقیقی گزارش داده شده که ارقام پیشتاز، چمران، سیستان دارای مقاومت اختصاصی به چند نژاد بیماری‌زایی زنگ زرد در برخی مناطق بودند و برای سایر مناطق عکس‌العمل حساسیت نشان داده‌اند اما ردیابی این‌که کدام‌یک از ژن‌های مقاومت در بروز این نوع مقاومت نقش داشته و به‌دلیل نبودن واکنش حساسیت در بین جدایه‌ها، مشکل است. برای این منظور پیشنهاد شد باید از نشانگرهای مولکولی برای تشخیص استفاده گردد از طرفی ذکر گردیده که وجود هر یک از این ژن‌ها در این ارقام می‌تواند موجب بروز مقاومت گردد، لذا به‌دلیل زیاد بودن ژن‌ها ردیابی اینکه کدام‌یک از ژن‌های مقاومت در این کدام ارقام وجود دارند مشکل است، لذا برای اطمینان کامل از این امر استفاده از نشانگرهای مولکولی ضروری است (Omrani *et al.*, 2011).

در فن گزینش به کمک نشانگر[1] همبستگی بین نشانگرهای DNA و صفات مهم زراعی هم چون مقاومت به عوامل بیماری‌زا، حشرات، نماتدها، تحمل به تنش‌های غیر زنده، پارامترهای کیفیت و صفات کمی مورد بررسی قرار می‌گیرد؛ در این روش نشانگرهایی که در مجاورت ژن هدف قرار دارند، شناسایی و انتخاب شدند، به این ترتیب این روش به شناسایی گیاهان حامل ژن‌های هدف به‌طور هم‌زمان و بدون قرار دادن در معرض هجوم پاتوژن در نسل‌های اولیه، کمک خواهد کرد(Arzani *et al.*, 2006b).

ظهور نژادهای جدید قارچ عامل بیماری در یک منطقه و فراهم شدن شرایط محیطی مناسب می‌تواند طی چند سال باعث استقرار آن نژاد و بروز همه‌گیری‌های شدید شود (Omrani *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2016). از طرفی با توجه به اهمیت زنگ‌ها در ایران و سایر نقاط دنیا مبارزه‌ای لازم است که بتوان خسارت وارده را اصولی و پایدار کمتر کرد. لذا از میان روش‌های مبارزه با زنگ‌ها می‌توان به استفاده از ارقام مقاوم اشاره کرد. مقاوم کردن ژنتیکی گیاهان مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین روش مبارزه با زنگ‌ها است. مقاوم کردن ارقام زراعی مزایای زیادی نسبت به‌کارگیری مواد شیمیایی و سایر روش‌های مبارزه دارد. زیرا هزینه سموم، نیروی کار و زمان کاهش پیدا می‌کند (Shafie *et al.*, 2010). ضمناً شناسایی و جداسازی ژن‌های مقاومت در ارقام مقاوم و حساس گندم نان به‌منظور شناسایی تنوع تک نوکلئوتیدی برای تولید نشانگرهای اختصاصی جهت غربال ارقام مقاوم و حساس و بررسی تنوع نوکلئوتیدی این ارقام از نظر ژن‌های مقاومت به زنگ زرد، سیاه و قهوه‌ای و تعیین نحوه کنترل ژنی مقاومت در ارقام مقاوم جهت استفاده در

1. Marker *Assisted* Selection

برنامه اصلاح برای مقاومت (Badakhshan *et al.*, 2008; Naji *et al.*, 2008) از دیگر اهداف این تحقیق است. بر این اساس می‌توان از پیوستگی نشانگرهای مولکولی به ژن‌های مقاومت و گزینش با کمک نشانگر که روشی سریع و مطمئن برای شناسایی ژن‌های مقاومت در برنامه‌های اصلاحی گندم است (Afshari, 2006; Weng *et al.*, 2007) استفاده کرد و چون ارقام مورد استفاده در این تحقیق قبلاً از طرق مختلف آزمون‌های مزرعه‌ای، سطح مقاومت آن‌ها در سطح کشور بررسی شده ولی چون روش‌های سنتی بررسی مقاومت، هزینه و زمان‌بر بوده لذا در تحقیق حاضر سعی شد تا با استفاده از گزینش با کمک نشانگر بتوان سطح مقاومت به بیماری زنگ در آن‌ها را از طریق نشانگر ریزماهواره[1] نیز بررسی و صحت آن‌ها تائید و همچنین به روشی دست‌یابی پیدا کنیم که در آینده بتوان بدون صرف وقت زیادی و هزینه بالای روش‌های سنتی، ارقام مختلف گندم را از لحاظ مقاومت به زنگ بررسی نمود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

تعداد ۱۰ رقم گندم رایج سیستان (جدول ۱) از مرکز تحقیقات کشاورزی زابل تهیه و با استفاده از نشانگر SSR در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی دانشگاه زابل در سال ۱۳۹۶ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

سیستان در شرق ایران و شمال استان سیستان و بلوچستان در دشت پست و همواری در ۳۰ درجه و ۱۸ دقیقه تا ۳۱ درجه و ۲۰ دقیقه عرض شمالی و ۶۱ درجه و ۱۰ دقیقه تا ۶۱ درجه و ۵۰ دقیقه طول شرقی، نسبت به نیمروز گرینویچ قرار دارد. مساحت دشت سیستان ۱۵۱۹۷ کیلومترمربع است که ۵۵۶۰ کیلومترمربع آن را دریاچه هامون و اراضی مشرف‌به دریاچه هامون تشکیل می‌دهد (Anonymous, 1997).

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

استخراج DNA ژنومی چهل روز بعد از کاشت ارقام و از برگ بر مبنای روش SDS[2] (Dellaporta *et al.*, 1983) به‌صورت تک بوته و از هر رقم تعداد ۳ بوته انجام شد. تعداد ۱۰ آغازگر SSRs برای این تحقیق انتخاب شدند (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر اساس دستورالعمل رادر و همکاران (Roder *et al.*, 1998) صورت گرفت. سپس سیکل حرارتی بدین‌صورت که شش دقیقه واسرشته سازی (Denaturing) اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ سیکل (تک‌رشته‌ای شدن DNA در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵۰ ثانیه؛ اتصال آغازگر به DNA تک‌رشته‌ای در دمای مختص هر آغازگر به مدت یک دقیقه و بسط آغازگر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه) و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در این آزمایش از ژل آگارز ۲/۵ درصد با بافر واکنش TAE(1x) برابر، به‌این‌ترتیب که ابتدا میزان ۱۰-۲۰ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری به DNA های تکثیرشده اضافه و سپس میزان ۵ میکرو لیتر از هر نمونه به درون چاهک‌های ایجادشده در ژل آگاروز ۲/۵ درصد لود شده و با ولتاژ ثابت ۸۰-۱۰۰ ولت به مدت ۱/۵-۲ ساعت ران شد و سپس جهت رنگ‌آمیزی ژل از GelRed و دستگاه ترانس ایلومیناتور جهت نمایان شدن باندها استفاده شد.

1. Single sequence repeat (SSR)

2. Sodium dodecyl sulfate

جدول ۱. نام و مشخصات ارقام گندم استفاده شده در این آزمایش

Table 1. Name and characterisitic of wheat cultivars were used in this research

Row	Cultivar name	Stem Rust	Leaf rust	Yellow rust	Pedigree	References
1	افلاک Aflak	–	Resistant	Resistant	HD5/160/Tob/Cno3/23854//Nai60//Tit/Son4/64/LR/Son64	(Dadrezaei & Nazari, 2015; Mirzania *et al.*, 2015; Anonymous, 2017)
2	افق Ofogh	–	Resistant	Resistant	*Attila/GF-gy54*	(Spii, 2015)
3	کویر Kavir	–	Resistant	Resistant	Stm/3/Kal//V534/Jit716	(Sarani *et al.*, 2011; Mirzania *et al.*, 2015; Anonymous, 2017; Dadrezaei & Nazari, 2015)
4	ارگ Arg	–	Resistant	Resistant	Inia/1-66-22	(Amini Sefidab *et al.*, 2012; Anonymous, 2017)
5	سیستان Sistan	–	Resistant	Resistant	"Bank"s"/Vee"s"	(Mirzania *et al.*, 2015; Anonymous, 2017; Dadrezaei & Nazari, 2015)
6	هیرمند Hirmand	–	Resistant	Resistant	Byt/4/Jar//Cfn//Sr70/3/Js"up	(Dadrezaei & Nazari, 2015; Sarani *et al.*, 2011; Mirzania *et al.*, 2015; Anonymous, 2017)
7	هامون Hamoon	–	Susceptible	Susceptible	Falat/Roshan	(Dadrezaei & Nazari, 2015) (Akbari Moghadam *et al.*, 2004; Saeeidi, 2005; Sarani *et al.*, 2011; Anonymous, 2017)
8	کلک افغانی K-Afgh	–	Susceptible	Susceptible	Native	(Sarani *et al.*, 2011; Anonymous, 2017)
9	بولانی Bolani	–	Susceptible	Susceptible	Native	(Sarani *et al.*, 2011; Bakhtiar *et al.*, 2015; Anonymous, 2017)
10	کراس بولانی K-bolani	–	Susceptible	Susceptible	Native	(Bijan Zadeh *et al.*, 2011)

جدول ۲. نام، توالی، دمای اتصال، نوع وابستگی به ژن مقاومت به زنگ آغازگرهای SSRs مورد استفاده

Table 2. Name, Sequence, Tm and kind of association to rust resistance gene (s) of SSRs markers

Primer name	Chromosomal Location	Reverse /Forward	Sequence 5´→ 3´	Tm (C°)	Genes association to rust resistance	Genes Resistance Alleles	Reference
Xgwm44	7D	F R	GTTGAGCTTTTCAGTTCGGC ACTGGCATCCACTGAGCTG	59.5	Leaf Rust	Lr19	(Xing *et al.*, 2006)
Xgwm443	5B	F R	CCATGATTTATTAAATTCCACC GGGTCTTCATCCGCAACTCT	53	Leaf Rust	Lr52	(Hiebert *et al.*, 2005)
Xgwm533	6B And 3B	F R	AAGGCGAATCAAACGGAATA GTTGCTTTAGGGAAAAGCC	59.5	Leaf Rust and Yellow Rust	Sr2	(Hayden *et al.*, 2004)
SCS719	7D	F R	CTCGTCGATTAGCAGTGAG TCGTCCAGATCAGAATGTG	55	Stem Rust	Lr24/Sr24	(Cherukuri *et al.*, 2003)
Xwmc810	5B	F R	GGCACCGATGCTTCCA GCCCCACCTCCC	53.3	Yellow Rust	Yr88375	(Yang *et al.*, 2008)
XCFd36	2D	F R	TTAGAGTTTTGCAGCGCCTT GCAAAGTGTAGCCGAGGAAG	60	Leaf Rust	Lr41	(Sun *et al.*, 2009)
Xgdm116	5D	F R	GCTGCAATGCAAGGTCTCTT GATGTGGCTTTCTAAGGCAA	55.8	Yellow Rust	Yr88375	(Yang *et al.*, 2008)
Xgwm533	3B	F R	AAGGCGAATCAAACGGAAT GTTGCTTTAGGGGAAAAGCC	62	Yellow Rust	Yr88375	(Spielmeyer *et al.*, 2003)
X3B028F08	3B	F R	ACGAACAAGGGGAAGACG TTTCGGTAGTTGGGGGATGC	60	Stem Rust	Sr2	(Bernardo *et al.*, 2013)
12C	c	F	CCAGCTCGCATACATACCATCCA	59.8	Leaf Rust	Lr19	(Prins *et al.*, 2001a)

R CATCCTTTGGGGACCTC

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

برای تجزیه داده‌های حاصل از ارزیابی نشانگرهای ریزماهواره، باید ماتریس تشابه یا ماتریس فاصله را تشکیل داد. داده‌های حاصل، نوارهایی هستند که در فواصل مختلف ژل از یک مبدأ مشترک و ثابت یعنی ته چاهک قرار گرفته‌اند در نتیجه فاصله هر نوار (فاصله بر حسب میلی‌متر)، یک صفت کمی محسوب می‌شود و برای تجزیه، نیاز است که به صفات کیفی تبدیل شوند. این تبدیل به‌صورت حضور و عدم حضور یک نوار در یک فاصله مشخص از ته چاهک انجام می‌گیرد که می‌توان به‌صورت قراردادی به حضور عدد یک و عدم حضور عدد صفر اختصاص داد. در این تحقیق بعد از امتیازبندی نمره‌دهی به‌صورت صفر و یک الگوهای آللی صفاتی همچون تعداد آلل‌های تکثیر شده (AB)[1]، تعداد آلل‌های چند شکل (PB)[2]، تعداد آلل مؤثر (Ne)[3]، درصد چندشکلی (PP)[4]، شاخص چندشکلی (DI)[5]، شاخص شانن (I)[6]، شاخص نی (h)[7] و ارتباط بین تعداد آلل تکثیر شده توسط هر آغازگر SSR با شاخص چندشکلی اندازه‌گیری شد. شاخص چندشکلی که میزان آن بین صفر تا یک است (Agrama & Tuinstra, 2003) با استفاده از فرمول $DI = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_j^2$ (Pj فراوانی آلل j ام در تمام جمعیت‌های مورد ارزیابی) محاسبه شد (Botstein *et al.*, 1980). ضمناً شاخص نشانگری (MI) (Khaled *et al.*, 2015)، شاخص تنوع شانن (Lewontin, 1972)، شاخص تنوع نی (Nei, 1973) و تنوع بین و درون جمعیتی بر اساس نشانگر SSR با استفاده از نرم‌افزار POPGENE 1.32 محاسبه شد.

شاخص نشانگری[8] نشان‌دهنده کارایی نشانگر است و با استفاده از فرمول $MI = EMR * DI(or\ PIC)$ که در آن EMR نسبت چندگانه مؤثر بوده و بیانگر تعداد جایگاه‌های ژنی چند شکل موجود در یک ژنوم است به دست آمد. EMR با استفاده از فرمول $EMR = N_a * \beta$ که در آن Na تعداد مکان‌های چند شکل و ß نیز نسبت مکان‌های چند شکل به تعداد کل مکان‌ها است محاسبه شد (Khaled *et al.*, 2015).

محاسبه شاخص‌های تنوع نی، شانن، تعداد آلل مؤثر با نرم‌افزار POPGENE 1.32، تغییرات درون و بین ارقام با استفاده از تجزیه واریانس مولکولی با نرم‌افزار Gene Alex 6.5، تجزیه خوشه‌ای با ترسیم خوشه بر اساس روش UPGMA[9] مبتنی بر ماتریس تشابه نی و لی (Nei & Li, 1979) و با نرم‌افزار NTSYS-pc v.2.1 (Rolf, 2002) و Mega 6 (Tamura *et al.*, 2011) انجام شد.

نتایج و بحث

چندشکلی و شاخص‌های کمی

از ۱۰ آغازگر مورد استفاده در این تحقیق، ۹ آغازگر تکثیر کننده و چندشکل بودند (شکل ۱). در مجموع ۴۱ آلل شناسایی شد که آغازگرهای 12C، SCS 719 و Xgdm116 با ۳ آلل کمترین تعداد و آغازگر Xgwm443 با ۷ آلل بیش‌ترین تعداد را در میان آلل‌های تولیدی توسط هر آغازگر داشتند. میانگین تعداد آلل در کل جایگاه‌ها برابر ۴/۵۵ بود (جدول ۳). در پژوهش‌های پیشین از بررسی ریزماهواره‌ها در

1. Amplified Bands
2. Polymorphic Bands
3. Effective number of alleles
4. Percent of Polymorphic
5. Diversity Index
6. Shannon's Information index
7. Nei's gene diversity
8. Marker Index
9. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

گندم (هرچند در این پژوهش‌ها از ژنوتیپ‌های متفاوت استفاده کرده‌اند اما حدود آللی تکثیر شده در این پژوهش با پژوهش‌های قبلی مقایسه شد) نیز نتایج تقریباً مشابهی حاصل گردیده است به‌طوری‌که تعداد آلل در گندم را از ۱۰-۲ با میانگین ۵/۳ (Fazeli-nasab, 2012)، ۹-۲ با میانگین ۵/۴۲ (Akkaya & Buyukunal-Bal, 2004)، ۵-۲ با میانگین ۲/۶۷ (Pal *et al.*, 2015)، ۱۱-۳ با میانگین ۵/۵۹ (Salem *et al.*, 2015) و ۶-۲ و میانگین ۴/۲ (Moradkhani *et al.*, 2012) گزارش گردیده است. در عین حال گزارش‌های متفاوت‌تری نیز از چندشکلی ریزماهواره‌ها در گندم از جمله؛ تعداد آلل را از ۱۹-۴ با میانگین ۱۲/۳۵ (Mollaheydari Bafghi *et al.*, 2014)، ۲۰-۲ با میانگین ۱۱/۸۴ (Sardouie Nasab *et al.*, 2013)، ۱۸-۱ با میانگین ۳/۰۵ (Akfirat *et al.*, 2013; Akfirat & Uncuoglu, 2013)، ۲۰-۱ با میانگین ۸/۱۴ (Wang *et al.*, 2007) و ۲۱-۵ با میانگین ۸/۴ (Guo *et al.*, 2014) ارائه شده است.

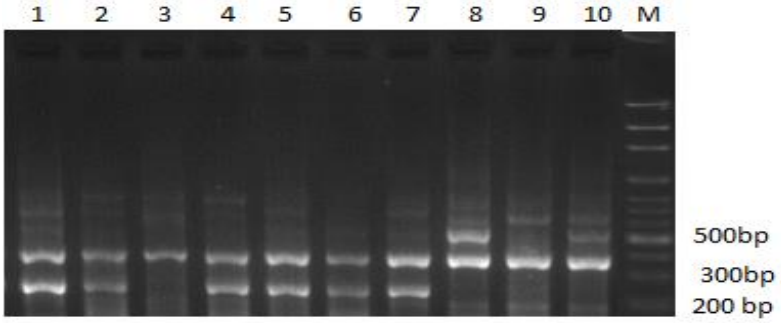
برای بررسی قدرت تفکیک آغازگرها در نمایش چندشکلی در یک جمعیت شاخص چندشکلی (DI) و شاخص نشانگری (MI) هر آغازگر محاسبه شد. کم‌ترین میزان شاخص چندشکلی با مقدار ۰/۱ مربوط به آغازگر XCFd36 و بیش‌ترین میزان شاخص چندشکلی با مقدار ۰/۳۹ مربوط به آغازگر Xgdm116 و با میانگین کل ۰/۲۸ مشاهده گردید. بیشترین شاخص نشانگری مربوط به آغازگر Xgwm533 با مقدار ۲/۲۹ و کم‌ترین شاخص نشانگری مربوط به آغازگر XCFd36 با ۰/۳۳ و میانگین کل ۱/۳۲ بود (جدول ۳). گوا و همکاران (Guo *et al.*, 2014) شاخص نشانگری را ۷/۳۲-۱/۷۸ با میانگین ۴/۰۴ گزارش دادند که با نتایج تحقیق حاضر مشابهت داشت اما در کل نتایج متفاوتی برای شاخص چندشکلی گندم ارائه شده است به‌طوری‌که میردریکوند و همکاران (Mir-Drikvand *et al.*, 2015)، شاخص چندشکلی را از ۰/۷۷-۰/۱۳، اصغری میرک (Asghari-Mirk *et al.*, 2011) شاخص چندشکلی را از ۰/۸۹-۰/۵، جمالی‌راد و همکاران (Jamalirad *et al.*, 2012) شاخص چندشکلی را از ۰/۹۰۲-۰/۵۶۳ و میانگین ۰/۶۸۸، دریکوند و همکاران (Drikvand *et al.*, 2013) چندشکلی را از ۰/۸۰-۰/۱۲ و میانگین ۰/۵۹ به دست آوردند. از تمام نتایج بالا به‌علاوه نتایج این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که شاخص چندشکلی نمی‌تواند عدد ثابتی داشته باشد و بستگی به عواملی مثل تعداد باند تولیدی توسط هر جایگاه، تعداد ژنوتیپ و تعداد آغازگر دارند (Prasad *et al.*, 2000). بر این اساس رادر و همکاران (Roder *et al.*, 1995) میانگین شاخص چندشکلی را در تحقیقی با ۱۸ ژنوتیپ و ۱۵ آغازگر در گندم را ۰/۶۳ و همین مقدار را زمانی که تعداد ژنوتیپ‌ها ۶ عدد بود ۰/۵۴ به دست آوردند (Prasad *et al.*, 2000).

برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی بین و درون یک جمعیت، شاخص تنوع ژنی نی (h)، شاخص شانن (I) و تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) آغازگرها در ارقام گندم مورد مطالعه محاسبه شد. در بین آغازگرها بیشترین میزان تعداد آلل مؤثر، شاخص تنوع شانن و شاخص تنوع نی به ترتیب ۱/۴۵، ۰/۶۳، ۰/۴۴ متعلق به آغازگر Xgdm116 و کمترین میزان آلل مؤثر، شاخص تنوع شانن و شاخص تنوع نی به‌ترتیب ۱/۱۸، ۰/۱۹، ۰/۱۱ متعلق به آغازگر XCFd36 و میانگین شاخص تنوع شانن (۰/۴۰) و شاخص تنوع نی (۰/۲۵) به دست آمد (جدول ۳) که با نتیجه ارائه شده توسط ابوزید و همکاران (Abouzied *et al.*, 2013) در گندم با میانگین شاخص تنوع شانن ۰/۴۵ و میانگین شاخص تنوع نی ۰/۲۸ مشابهت داشت اما در کل موارد متفاوتی برای شاخص تنوع شانن گزارش شده است مثلاً گوا و همکاران (Guo *et al.*,

2014) شاخص تنوع شانن را از ۰/۶۱-۰/۴۲ با میانگین ۰/۵۳ و وانگ و همکاران (Wang *et al.*, 2007) میانگین شاخص تنوع شانن را ۰/۵۸ گزارش دادند.

در بین ارقام گندم بیشترین درصد مکان چندشکل، تعداد آلل مؤثر، شاخص تنوع نی و شاخص تنوع شانن به ترتیب ۳۹/۵۳، ۱/۲۷، ۰/۱۶ و ۰/۲۳ متعلق به رقم ارگ و کمترین درصد مکان چندشکل، تعداد آلل مؤثر، شاخص تنوع نی و شاخص تنوع شانن به ترتیب ۱۲/۲، ۱/۰۷، ۰/۰۴، ۰/۰۶ متعلق به رقم هیرمند بود. ضمناً در تمام ارقام ۹۹ آلل تکثیر شد که رقم ارگ، با ۱۷ آلل بیش‌ترین تعداد و رقم هیرمند با ۵ آلل کمترین تعداد را در میان آلل‌های تکثیری توسط هر رقم داشتند. میانگین تعداد آلل در کل ارقام برابر با ۹/۹ بود (جدول ۴). در تحقیقی (Jamalirad *et al.*, 2012) تعداد آلل تکثیری در ارقام گندم مورد مطالعه از ۱۸-۳ و میانگین ۹/۲۶ مشاهده شده که با نتایج تحقیق حاضر مشابهت دارد. هر چند نتایج متفاوتی در گندم نیز از جمله، تعداد آلل از ۴-۲ و میانگین ۲/۳۶ (Mir-Drikvand *et al.*, 2015) و تعداد آلل از ۲۵-۱۰ و میانگین ۴/۱۶ (Asghari-Mirk *et al.*, 2011) گزارش شده است.

در این تحقیق حضور باندهای اختصاصی در ارقام گندم مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که بیشترین تعداد باند اختصاصی (۵ عدد) در رقم ارگ و توسط آغازگرهای Xgwm533، Xgwm44 و Xwmc810 و کم‌ترین تعداد (صفر) در ارقام افق، کویر، هیرمند، هامون، بولانی و کراس بولانی بود. ضمناً آغازگرهای Xgwm533 و Xgwm44 هر کدام با سه آلل بیش‌ترین تعداد آلل اختصاصی تولید کردند (جدول ۵). بیش‌ترین میانگین هتروزیگوسیتی (ناهمگنی) با میزان ۰/۱۶۱ مربوط به رقم ارگ و کم‌ترین میانگین هتروزیگوسیتی با میزان ۰/۰۴ مربوط به رقم هیرمند و با میانگین کل ۰/۱۶ بود (جدول ۵). با توجه به اینکه رقم ارگ نسبت به سایر ارقام مورد بررسی در این تحقیق دارای ژن‌های مقاومت بیش‌تری نسبت به زنگ است لذا می‌توان این باندهای اختصاصی را جداسازی و توالی‌یابی نمود (Sumathi & Ramasamy, 2017) و بر اساس توالی این باندها، آغازگر تهیه کرده و در تحقیقات بعدی جهت شناسایی ارقام مقاوم و حساس به زنگ از همین آغازگر استفاده نمود. هم‌چنین هتروزیگوسیتی نشان‌دهنده رویدادهایی از جمله تلاقی‌های دو جانبه، کراسینگ‌اور و غیره بوده و انتظار می‌رود همه این عوامل باعث ایجاد ترکیبات ژنتیکی متفاوتی شود. لذا گیاهان خودگشنی که درجه هتروزیگوسیتی آن‌ها بالا باشد انتظار می‌رود ترکیبات ژنی متفاوتی داشته باشند. در تحقیق حاضر رقم ارگ چون دارای بیش‌ترین تعداد ژن‌های مقاومت به زنگ است. بنابراین می‌توان در برنامه‌های اصلاحی مقاومت به بیماری زنگ از این رقم در دورگ‌گیری‌ها استفاده نمود. ضمناً آغازگرهای Xgdm116، Xwmc810 و SCS719 مؤثرترین آغازگرها در شناسایی و جداسازی ارقام مقاوم و حساس بودند.



شکل ۱. الگوی نواری تکثیرشده در نشانگر SSR با استفاده از آغازگر Xgwm533

(اعداد ۱ تا ۱۰ شماره ارقام بوده و M سایز مارکر Simbio DM2300 است)

Figure 1. Band pattern produced in SSRs marker using Xgwm533 primer
(Numbers 1 to 10 are row of cultivars and M is the size of the Simbio DM2300)

جدول ۳. تعداد آلل تکثیرشده (AB)، تعداد آلل چندشکلی (PB)، درصد چندشکلی (PP)، تعداد آلل مؤثر (Ne)، شاخص چندشکلی (DI)، شاخص شانن (I)، شاخص نی (h) و شاخص نشانگری (MI)

Table 3. Amplified band(AB), Polymorphic bands(PB), Percentage of Polymorphism(PP), Effective number of alleles(Ne), Diversity Index(DI), Shannon's Information index(I), Nei gene Diversity(h) and Marker Index(MI) of all primers

Primer Name	DI	h	I	Ne	MI	PP	PB	AB
12C	0.27	0.17	0.30	1.23	0.81	100	3	3
SCS 719	0.31	0.33	0.47	1.62	0.93	100	3	3
Xgdm116	0.39	0.44	0.63	1.81	1.18	100	3	3
Xwmc 810	0.33	0.32	0.48	1.59	2	100	6	6
Xcfd36	0.11	0.11	0.19	1.18	0.33	75	3	4
Xgwm44	0.25	0.23	0.37	1.38	0.32	100	6	6
Xgwm133	0.28	0.22	0.36	1.36	1.68	100	6	6
Xgwm443	0.24	0.22	0.37	1.36	1.73	100	7	7
Xgwm533	0.32	0.29	0.44	1.50	2.98	100	3	3

جدول ۴. تعداد مکان‌های تکثیر شده (AB)، تعداد مکان‌های چندشکل (PB)، درصد مکان‌های چند شکل (PP)، تعداد آلل مؤثر (Ne)، شاخص تنوع شانن (I) و نی (H) در ارقام مورد مطالعه

Table 4. Amplified band (AB), Polymorphic bands (PB), Percentage of Polymorphism (PP), Effective number of alleles (Ne), Diversity Index (DI), Shannon's Information index (I), Nei gene Diversity (h) and Marker Index (MI) in all cultivars

Row	Cultivar name	AB	PB	PP	Na	Ne	h	I
1	Aflak	48	15	31.25	1.36	1.27	0.15	0.21
2	Ofogh	41	7	17.07	1.17	1.12	0.06	0.01
3	Kavir	37	11	29.73	1.26	1.17	0.10	0.15
4	Arg	43	17	39.53	1.41	1.27	0.16	0.23
5	Sistan	46	12	26.09	1.29	1.21	0.11	0.17
6	Hirmand	46	5	10.87	1.12	1.07	0.04	0.06
7	Hamoon	44	9	20.45	1.21	1.11	0.07	0.11
8	K-Afgh	45	9	20.00	1.21	1.13	0.07	0.11
9	Bolani	33	8	24.24	1.19	1.13	0.07	0.11
10	K-Bolani	48	6	12.50	1.14	1.13	0.07	0.11

جدول ۵. نام ارقام، تعداد باندهای تکثیر شده در هر رقم، آغازگرهایی که باند اختصاصی تولید کردند،، اندازه باند اختصاصی و میانگین هتروزیگوسیتی

Table 5. Cultivars name (CN), Amplified band per cultivar (ABC), Specific allele produced per each primer (SAP), Primers that produce the proprietary band (PPB), the size of specific band (SSB) and the mean of heterozygocity (NSB)

CN	ABC	SAP	PPB	SSB	NSB
Aflak	48	4	Xgwm133	129, 113	0.51
			SCS719	700	
			Xcfd36	195	
Ofogh	41	0	-	-	0.07
Kavir	37	0	-	-	0.103
Arg	43	5	Xwmc810	195	0.061
			Xgwm44	176, 165	
			Xgwm533	285, 305	
Sistan	46	2	Xgwm44	160	0.02
			12C	100	
Hirmand	46	0	-	-	0.04

Hamoon	44	0	-	-	0.075
K-Afgh	45	1	Xgwm443	204	0.08
Bolani	33	0	-	-	0.07
K-Bolani	48	0	-	-	0.071

ضریب تشابه و فاصله ژنتیکی

به‌منظور شناسایی و درک بهتر شباهت‌ها و تفاوت‌ها در میان ارقام مورد بررسی، ماتریس تشابه در بین ۱۰ رقم گندم مورد استفاده با توجه به ۴۱ آلل تولیدشده در نشانگر ریزماهواره، بر اساس روش نی و لی (۱۹۷۹) محاسبه گردید و بیش‌ترین میزان تشابه مربوط به ارقام افلاک و افق (۰/۹۴۰) و کم‌ترین میزان تشابه مربوط به ارقام هیرمند و ارگ (۰/۶۹۷) با میانگین ۰/۸۵۳ مشاهده گردید. هم‌چنین بیش‌ترین میزان فاصله ژنتیکی مربوط به ارقام هیرمند و ارگ (۰/۳۶۰) و کم‌ترین فاصله ژنتیکی مربوط به ارقام افق و افلاک (۰/۰۶۲) با میانگین ۰/۲۷ مشاهده گردید. تشابه ژنتیکی چون خاص ارقام و توده‌های مورد استفاده در هر تحقیق بوده، لذا گزارش‌های متفاوتی در مورد تشابه ژنتیکی ارائه شده است، به‌طوری‌که اصغری‌میرک و همکاران (Asghari-Mirk *et al.*, 2011)، تشابه ژنتیکی را از ۰/۰۸ تا ۰/۸۲، بندانی و همکاران (Bandani *et al.*, 2005)، از ۰/۱۲۵ تا ۰/۷۳ با میانگین ۰/۴۲، گوا و همکاران (Guo *et al.*, 2014)، از ۰/۵۶ تا ۰/۸۷ با میانگین ۰/۶۸، سفالیان و همکاران (Sofalian *et al.*, 2013)، میانگین فاصله ژنتیکی را ۰/۴۸۶، پروین و همکاران (Nagella & Murthy, 2014) میانگین شباهت ژنتیکی را ۰/۸۴، پال و همکاران (Pal *et al.*, 2015)، فاصله ژنتیکی را از ۰/۶۲ تا ۰/۸۴، دریکوند و همکاران (Drikvand *et al.*, 2013)، شباهت ژنتیکی را از ۰/۱۷ تا ۰/۸۸ گزارش دادند. بر اساس گزارش‌های متعدد ضریب تشابه تحت تأثیر تعداد ژنوتیپ، تعداد آغازگر و غیره قرار می‌گیرد (Agrama & Tuinstra, 2003; Kuleung *et al.*, 2006).

در گونه‌های دگرگشن به علت ایجاد ترکیب‌های ژنی جدید، جریان ژنی بالا و فشار شرایط محیطی حاکم بر منطقه، منجر به تثبیت یک سری ژن‌های خاص می‌شود لذا فاصله ژنتیکی درون ارقام پراکنده بوده و در عوض تنوع بین ارقام نسبتاً کم است (Rauf *et al.*, 2010) اما در گونه‌های خودگشن به دلیل وجود آلل‌های متفاوت درون هر جمعیت، تغییرات بیش‌تری درون ارقام وجود دارد (Rao & Hodgkin, 2002) و در کل هم در گیاهان خودگشن و هم دگرگشن در اکثر حالات تنوع درون جمعیت بیشتر از تنوع بین جمعیت بوده ولی این میزان تنوع در گیاهان خودگشن بیشتر از گیاهان دگرگشن است (Tarinejad, 2013; El-Esawi *et al.*, 2018).

در تحقیق حاضر نتایج تجزیه واریانس مولکولی تنوع ژنتیکی درون ارقام ۵۵ و بیشتر از تنوع بین ارقام که ۴۵ درصد به‌دست‌آمده، بود (جدول ۶). وجود تنوع بالا در درون جمعیت در تحقیقات مختلف دیگر با استفاده از نشانگر ISSR و SSRs در گندم گزارش شده است (Tarinejad, 2013; Khan *et al.*, 2015; Moradkhani *et al.*, 2015).

از عوامل مؤثر در توجیه تنوع بیشتر در درون جمعیت مواردی از جمله خودگشن بودن گیاه، یک‌ساله بودن، ازدیاد با بذر، تعداد مکان‌های آللی مورد بررسی، موقعیت آللی و ژنوتیپی جمعیت، نوع تلاقی و اندازه جمعیت را می‌توان ذکر نمود (Pezhmanmehr *et al.*, 2009) بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام به دلیل دخالت چندین عامل از جمله پیوستگی، تلاقی خویشاوندی، مهاجرت و تفاوت‌های موجود در افراد تشکیل‌دهنده ارقام دارای پیچیدگی‌هایی است (Mohammadi & Prasanna, 2003).

با توجه به اینکه فاصله ژنتیکی بیشتر ممکن است با صفات مطلوب مرتبط باشد درنتیجه می‌توان پس از بررسی‌های بیشتر، از آن‌ها در برنامه‌های بهنژادی استفاده کرد (Bahari *et al.*, 2015). در نتیجه

ضرورت دارد در برنامه‌های اصلاحی و پیدا کردن ژن‌های مفید به ارقامی که بیشترین تنوع دارند توجه بیشتری شود لذا چون کم‌ترین میزان تشابه مربوط به ارقام ارگ و هیرمند و از طرفی نیز بیش‌ترین تنوع درون جمعیتی مربوط به رقم ارگ بوده، در نتیجه می‌توان ذکر کرد که جهت دست‌یابی به صفات دلخواه در ارقام گندم از رقم ارگ به‌عنوان یکی از پایه‌های پدری یا مادری و یا دهنده ژن در دورگ‌گیری‌ها در برنامه‌های اصلاحی استفاده نمود.

تجزیه خوشه‌ای

بر اساس آغازگرهای متصل به ژن‌های مقاومت به زنگ زرد

تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه گندم بر اساس آلل‌های تولیدی توسط آغازگرهایی که به ژن مقاومت به زنگ زرد متصل بودند (Xgdm116، wmc810 و Xgwm533)، با استفاده از ریزماهواره‌ها، ضریب شباهت ژنتیکی نی و لی و روش UPGMA انجام شد (r=۰/۹۵ (همبستگی کوفنیتک)). ارقام در ناحیه‌ای که تنوع بین گروهی بیشتر از درون‌گروهی بود (خط برش در ۰/۱۵) به دو گروه مختلف مقاوم شامل؛ افق، افلاک، کویر، ارگ، سیستان و هیرمند و حساس؛ هامون، کلک افغانی، بولانی و کراس بولانی طبقه‌بندی شدند (شکل ۲).

بر اساس آغازگرهای متصل به ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای

تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه گندم بر اساس آلل‌های تولیدی توسط آغازگرهای که به ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای متصل بودند (12C، xcfd36، xgwm44، xgwm133 و xgwm443)، با استفاده از ریزماهواره‌ها، ضریب شباهت ژنتیکی نی و لی و روش UPGMA انجام شد (r=۰/۹۴ (همبستگی کوفنیتک)). ارقام در ناحیه‌ای که تنوع بین گروهی بیشتر از درون گروهی بود (خط برش در ۰/۰۶۴) در سه گروه مختلف طبقه‌بندی شدند. در گروه اول ارقام بولانی، کراس بولانی، کلک افغانی، هامون که همگی حساس به زنگ قهوه‌ای می‌باشند و در گروه دوم و سوم ارقام سیستان، هیرمند، کویر، ارگ، افق و افلاک که همگی مقاوم به زنگ قهوه‌ای می‌باشند قرار گرفتند (شکل ۳).

بر اساس آغازگرهای متصل به ژن‌های مقاومت به زنگ سیاه

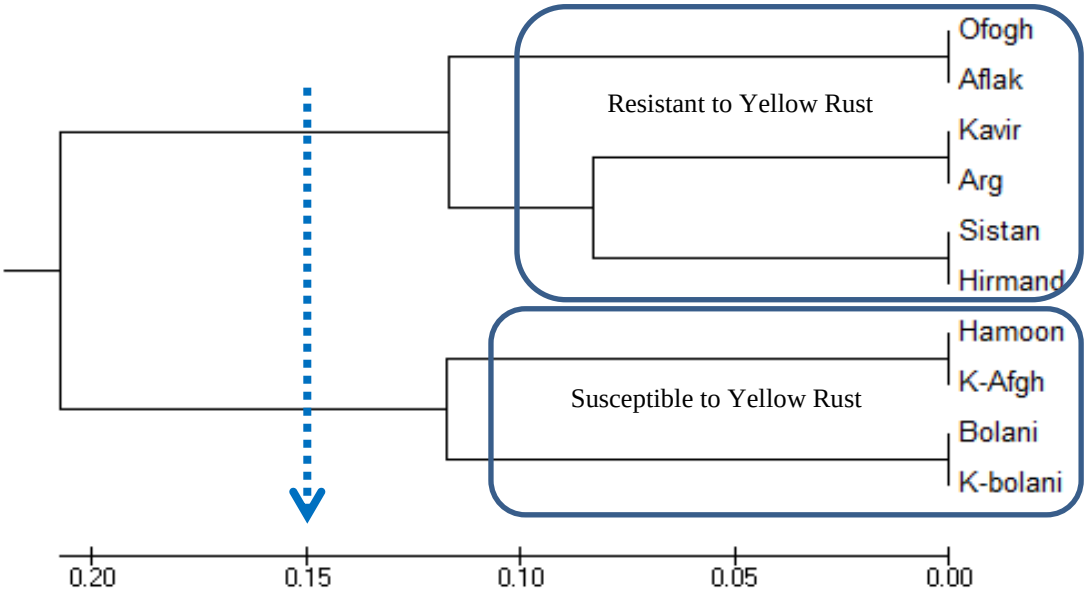
ضمناً ارقام بر اساس آغازگرهایی که به ژن‌های مقاومت به زنگ سیاه متصل بودند (X3BO28-F و SCS719) ارزیابی شدند که فقط آغازگر SCS719 تکثیر شد لذا تجزیه خوشه‌ای صورت نگرفت. عدم تکثیر آغازگر متصل به ژن مقاومت به زنگ سیاه و فقط تکثیر یک آغازگر نشان‌دهنده حضور کمتر ژن‌های مقاومت به زنگ سیاه در ارقام رایج سیستان است (جدول ۱). البته در بررسی‌ها نیز همین موضوع را نشان داده است (Sarani *et al.*, 2011; Anonymous, 2017).

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در ژنوتیپ‌های گندم انجام و مشخص شد برای زنگ زرد و قهوه‌ای برای سه مؤلفه اول به‌ترتیب در کل ۵۲/۳۸ و ۴۹/۹۸ درصد از واریانس کل را توجیه کردند. از طرفی کاهش اطلاعات به دو یا سه مؤلفه اصلی به‌منظور بیان ویژگی‌های عمده داده‌ها به شکل ساده‌تر امکان‌پذیر و تا حدودی بیانگر گروه‌بندی به‌دست‌آمده از روش تجزیه خوشه‌ای بوده و نشان دهنده این است که اکثر نشانگرها، اطلاعات مستقلی را در رابطه با ساختار ژنتیکی ارقام مختلف گندم در این مطالعه ارائه می‌دهند

جدول ۶. تجزیه واریانس مولکولی بر روی ۱۰ رقم گندم رایج سیستان با استفاده از نشانگر ریزماهواره

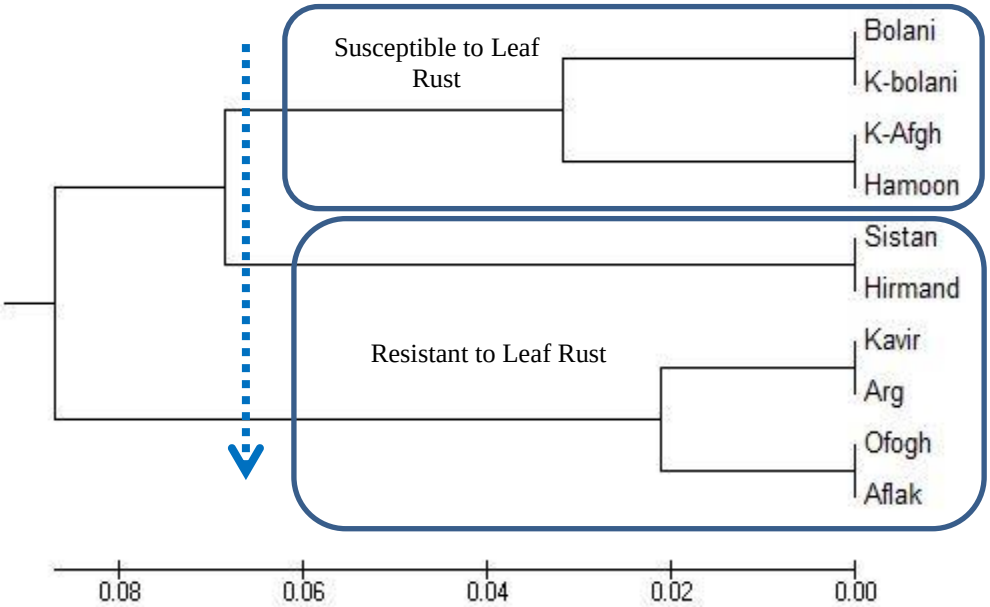
Table 6. Molecular variance on 10 Sistan native wheat cultivars using SSRs marker

S.O.V	Df	SS	MS	Molecular variance	Diversity (%)
Between cultivars	9	103.167	11.443	2.721	45
Within cultivars	20	66.000	3.30	3.300	55
Total	29	169.167		6.021	100



شکل ۲. تجزیه کلاستر ارقام گندم سیستان بر اساس مقاومت به بیماری زنگ زرد با توجه به نشانگر ریزماهواره، ماتریس تشابه نی و لی و روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار Mega 6

Figure 2. Cluster analysis of wheat cultivars in Sistan based on yellow rust disease according to microsatellite markers, Nei and Lee similarity matrix and UPGMA method using Mega 6 software



شکل ۳. تجزیه خوشه‌ای ارقام گندم سیستان بر اساس نشانگر ریزماهواره برای بیماری زنگ قهوه‌ای، ماتریس تشابه نی و لی و روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار Mega 6

Figure 3. Cluster analysis of wheat cultivars in Sistan based on brown rust disease according to microsatellite markers, Nei and Lee similarity matrix and UPGMA method using Mega 6 software

در تحقیقی وضعیت بیماری‌زایی عامل بیماری زنگ زرد گندم (*Puccinia striiformis* f. sp *tritici*) و عکس‌العمل ارقام تجاری گندم در برابر بیماری در دهه اخیر در استان فارس بررسی و به این نتیجه رسیدند که سال موکول به انجام تحقیق یا قبل از آن مقاومت ۱۲ رقم از ارقام تجاری گندم شامل چمران، شیرودی، استار، داراب ۲، فلات، شیراز، کویر، شهریار، زرین، الموت، الوند و بهار نسبت به زنگ زرد شکسته شده است. اما رقم پیشتاز واکنش نیمه حساسیت تا مقاومت را در مناطق مختلف فارس نشان داده ولی رقم نیک نژاد از بدو معرفی تا زمان آزمایش این تحقیق از واکنش مصونیت تا مقاومت برخوردار بوده است. علی‌رغم حساس شدن تعداد قابل‌توجهی از ارقام گندم در استان فارس به زنگ زرد و نیز با وجود اینکه پاتوتیپ‌های جدید و قوی آن می‌توانند برخی از ارقام گندم را در سال‌های مختلف مورد تهدید قرار دهند و همه‌ساله در قسمتی از مزارع استان شیوع یافته و منجر به خسارت اقتصادی شوند، با این وجود رعایت عواملی از قبیل استفاده از تنوع ژنتیکی ارقام مقاوم و متحمل در مناطق مختلف، ارتقا ء مدیریت مزرعه، رعایت اصول صحیح زراعی (تراکم مناسب بوته در واحد سطح، خودداری از مصرف بیش از حد مورد لزوم کودهای ازته و خودداری از آبیاری بیش از حد نیاز گیاه)، تقویت شبکه مراقبت به‌منظور پیش‌آگاهی مؤثر و ارائه توصیه‌های فنی و ضروری به کشاورزان و در صورت لزوم مبارزه شیمیایی به‌موقع با قارچ‌کش‌های مؤثر همراه با ارتقای کیفیت سم‌پاشی‌ها می‌توانند تأثیر بسزایی در روند افزایش و ثبات تولید گندم در استان فارس داشته باشند (Zakeri *et al.*, 2017).

با توجه اینکه امکان شکسته شدن مقاومت به زنگ در گندم یعنی ایجاد موتاسیون در ژن‌های مقاومت و یا ظهور پاتوتیپ‌های جدید وجود دارد و از طرفی نیز بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق که نشان داد می‌توان ژن‌های مقاومت به زنگ را در ارقام مختلف گندم ردیابی کرد لذا پیشنهاد می‌گردد ابتدا ارقام مختلف را بر اساس حضور و یا عدم حضور ژن‌های مقاومت بررسی و سپس ارقام مقاوم را از لحاظ نوع ژن‌ها دسته‌بندی کرده و در برنامه‌های اصلاحی می‌توان ارقامی را با بیشترین تعداد ژن‌های مقاومت تولید نمود تا ضمن کاهش هزینه‌های مبارزه با بیماری زنگ امکان شکسته شدن مقاومت را به سال‌های طولانی‌تری موکول کرد. بدون شک جستجوی دائمی در یافتن ژن‌های مقاومت جدید در مرحله گیاه کامل و استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی با هدف تقویت منابع ژنتیکی مقاومت و افزایش تنوع ژنتیکی نسبت به زنگ‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Rajaram *et al.*, 1988; Rajaram *et al.*, 1996).

طول مدت مؤثر ماندن مقاومت حاصل از ژن‌های مقاومت، به نحوه استفاده از این ژن‌ها بستگی دارد، لذا هنر به کار گرفتن این منابع ژنی نه‌تنها به مدت زمان دوام مقاومت ارقام کمک می‌نماید بلکه از جهت این‌که ژن‌های مؤثر مقاومت از ذخایر با ارزش ژنتیکی برای کنترل این بیماری هستند، حفظ این ذخایر از جمله اهداف مهم ذخایر توارثی است. استفاده غیر اصولی و بدون برنامه‌ریزی منجر به تحریک، ایجاد و افزایش جمعیت شده که برخی ژن‌های مفید با فراوانی کم حذف و یا غیر مؤثر می‌گردند (Omrani *et al.*, 2011).

در تحقیق حاضر مشخص شده که نشانگر

ریزماهواره دارای قابلیت بالایی در شناسایی و جداسازی ارقام مختلف از لحاظ مقاومت به زنگ‌ها می‌باشد؛ همچنین استفاده از قابلیت نشانگرهای مختلف در شناسایی و جداسازی مقاومت در تحقیقات دیگر نیز بررسی شده است به‌طوری‌که در تحقیقی (Abdollahi Mandoulakani *et al*., 2015) جهت ارزیابی گندم وحشی امر با استفاده از IRAPهای جداسازی‌شده از نشانگرهای SCAR پیوسته به ژن‌های مقاومت به زنگ زرد به این نتیجه رسیدند که نشانگر IRAP دارای قابلیت بسیار بالایی در شناسایی دقیق موقعیت ژن‌ها و نشانگرهای پیوسته به ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها می‌باشد.

در تحقیق حاضر اکثریت ژن‌های مقاومت به زنگ در گندم‌های ایرانی مورد استفاده در منطقه سیستان تکثیر شدند که این حضور ژن‌ها می‌تواند به این دلیل باشد که بسیاری از گندم‌های ایرانی تجاری بوده و در شجره آن‌ها ارقام حامل ژن‌های مقاومت به زنگ‌ها استفاده شده است که با نتایج تحقیقات قبلی مشابهت داشت (Bagherikia *et al*., 2014). ضمناً تحقیق حاضر اولین گزارش در مورد حضور ژن‌های فوق در ژنوم گندم نان ایرانی منطقه سیستان است. ضمناً بر اساس حضور اکثریت ژن‌های مقاومت به زنگ در گندم‌های منطقه سیستان و همچنین گزارش‌های موجود از مقاومت بالای ارقام مورد استفاده در سطح کشور، می‌توان نتیجه گرفت که تنوع ژنتیکی مقاومت در این ارقام با منابع مختلف مقاومت همبستگی بالایی دارد و عامل مقاومت در آن‌ها بر گرفته از حضور متعدد ژن‌های مختلف می‌باشد (Afshari, 2006)، به‌طوری‌که در تحقیقی که ۴۸ رقم و لاین گندم ایرانی با استفاده از آزمون مورفولوژیکی و نشانگرهای مولکولی پیوسته به ژن Lr32 نسبت به زنگ قهوه‌ای مورد ارزیابی قرار داده بودند و مشخص کردند که ۱۷ رقم از ۴۸ رقم مورد مطالعه، نسبت به جدایه‌های بیماری‌زا بر روی ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای *Lr32* از خود تیپ آلودگی پایین‌تری نشان دادند. لذا پیشنهاد دادند که مقاومت موجود در این ارقام و لاین‌ها، ناشی از حضور ژن یا ژن‌هایی، غیر از ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای *Lr32* می‌باشد (Shafie *et al*., 2010).

در تحقیقاتی گزارش شده که وجود ژن‌های مقاومت به بیماری زنگ (*Lr26* و *Yr9*) به علت فاصله ۶/۶ سانتی‌مورگان از *Sec-1* به‌طور وسیعی در برنامه‌های اصلاحی گندم استفاده شده‌اند در نتیجه، شناسایی این ژن‌ها به‌منظور بهره‌برداری از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی از اهمیت بالایی برخوردار است (Yediay *et al*., 2010) از طرفی در تحقیق حاضر نیز ژن‌های *Lr26* و *Yr9* در گندم‌های سیستان تکثیر شده‌اند لذا می‌توان ارقامی همچون ارگ که دارای این ژن‌ها و بیشترین تعداد ژن‌های مقاومت به زنگ زرد و قهوه‌ای بوده در برنامه‌های اصلاحی و یا در تولید ارقام جدید گندم استفاده نمود.

یکی از رویکردهای مهندسی ژنتیک برای مبارزه با آفت‌ها و بیماری‌های گیاهی، مقاوم کردن گیاه از طریق دست‌کاری ژنتیک و انتقال ژن است. تولید گیاهان تراریخته حاوی ژن‌های تولیدکننده پروتئین‌های سمی که در مقابل آفت‌ها و بیمارگرهای خاصی بسیار سمی و مؤثر بوده و در عین حال برای انسان، گیاه، محیط زیست و حشرات مفید، زیانی ندارند، از مثال‌های کاربردی مهندسی ژنتیک در کشاورزی است. با توجه به اینکه بهترین شیوه کنترل بیماری‌ها مخصوصاً بیماری زنگ، استفاده از ارقام مقاوم است و چون مقاومت از خصوصیات ژنتیک میزبان است که متخصصین اصلاح نباتات از آن برای تولید ارقام مقاوم استفاده می‌کنند. لذا از لاین‌هایی که در یک بررسی مقاوم تشخیص داده می‌شوند می‌توان در برنامه به نژادی دیگر، به‌عنوان منبع مقاومت استفاده کرد. همچنین مقاومت ژنتیک، میزان مصرف سموم شیمیایی را کاهش داده و یا حذف می‌کند و در نتیجه به‌عنوان اقتصادی‌ترین و از لحاظ زیست‌محیطی، سالم‌ترین روش مبارزه با

بیماری‌های گیاهی مطرح است (Asghari *et al.*, 2013) در نتیجه بر اساس نتایج تحقیق حاضر بهتر است که ارقامی مانند ارگ در برنامه به نژادی دیگر مورد استفاده و ارزیابی قرار گیرند.

شناسایی، جداسازی و توالی‌یابی آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت در ارقام مقاوم و حساس گندم نان به‌منظور شناسایی تنوع تک نوکلئوتیدی برای تولید نشانگرهای اختصاصی جهت غربال ارقام مقاوم و حساس و بررسی تنوع نوکلئوتیدی این ارقام از نظر ژن‌های مقاومت به زنگ زرد، سیاه و قهوه‌ای و تعیین نحوه کنترل ژنی مقاومت در ارقام مقاوم جهت استفاده در برنامه اصلاح برای مقاومت را از دیگر نتایج همچون تحقیقاتی می‌باشد (Badakhshan *et al.*, 2008; Naji *et al.*, 2008) از طرفی پیوستگی نزدیک به ژن‌های مقاومت و گزینش با کمک نشانگر روشی سریع و مطمئن برای شناسایی ژن‌های مقاومت در برنامه‌های اصلاحی گندم است (Afshari, 2006; Weng *et al.*, 2007) و چون در تحقیق حاضر نشانگرهای Xgdm116، Xwmc810 و SCS719 دارای بیشترین نقش در جداسازی ارقام بودند لذا جهت انتخاب به کمک نشانگر پیشنهاد می‌گردند.

علی‌رغم استفاده گسترده از ژن‌های مقاومت به زنگ در گندم در برنامه‌های اصلاحی جهان، از جمله آمریکا، چین، مکزیک و بسیاری از کشورهای اروپایی به نظر می‌رسد هنوز در برنامه‌های اصلاحی ایران به‌طورجدی مورد توجه قرار نگرفته است. با توجه به اینکه گزینش با کمک نشانگر روشی سریع و مطمئن برای شناسایی ژن‌های مقاومت در برنامه‌های اصلاحی گندم است، لذا می‌توان از ارقام گندم منطقه سیستان معرفی‌شده در این تحقیق در برنامه‌های اصلاحی کشور به‌منظور ایجاد ارقام جدید استفاده کرد (Bagherikia *et al.*, 2014).

روش‌های مختلفی به‌منظور بررسی ژن‌های مقاومت به زنگ و تعیین ژنوتیپ‌های مقاومت در ارقام گندم از طریق داده‌های تیپ آلودگی برودر (Browder, 1973) و بررسی صحت نتایج به‌دست‌آمده به‌وسیله روش ژنتیکی معرفی گردیده است (Loegering & Browder, 1971; Statler, 1984). علاوه بر آزمون‌های تیپ آلودگی، تکنیک گزینش به کمک نشانگر نیز نقش بسیار مهمی در شناسایی ژن‌های مقاومت ایفا کرده و مطالعات وسیعی در این زمینه انجام گردیده است (Gupta *et al.*, 2005). به این ترتیب این روش به شناسایی گیاهان حامل ژن‌های هدف به‌طور هم‌زمان و بدون قرار دادن در معرض هجوم پاتوژن یا حشره در نسل‌های اولیه، کمک خواهد کرد (Arzani *et al.*, 2006a). از طرفی گزارش شده که بعضی از ارقام دارای ژن مقاومت در مرحله گیاه کامل و بعضی دارای ژن‌های مقاومت در مرحله گیاهچه ای می‌باشند (Saini, 1993; Asghari *et al.*, 2013). لذا نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داده که تمامی ژن‌های مورد بررسی در مرحله گیاه‌چه‌ای آزمایش شده و این ژن‌های دارای قابلیت انتخاب در مرحله گیاه‌چه‌ای و ذخیره زمان و هزینه در زمان ارزیابی سطوح مقاومت ارقام مختلف می‌باشند.

با توجه به اینکه ایران خاستگاه گندم بوده و از طرفی سیستان نیز انبار غله جنوب و جنوب شرق کشور است در نتیجه انتظار می‌رود در ایران و سیستان تنوع ژنتیکی بین و درون ارقام مختلف گندم زیاد باشد که نتایج این تحقیق نیز همین اطلاعات را نشان داد. با توجه به اینکه بیشترین فاصله ژنتیکی بین رقم ارگ (مقاوم به تمام زنگ‌ها) و هیرمند (حساس به تمام زنگ‌ها) بوده و نیز بیشترین تنوع درون جمعیتی مربوط به رقم ارگ بوده و از طرفی رقم ارگ دارای بیشترین آلل اختصاصی نیز است، لذا می‌توان توصیه کرد که در دورگ‌گیری‌ها در برنامه‌های اصلاحی گندم جهت مقاومت به بیماری زنگ بهتر است رقم ارگ به‌عنوان یکی از پایه‌های

پدری یا مادری و یا دهنده ژن انتخاب شود. همچنین جهت ایجاد ترکیب‌های ژنی جدید می‌توان از تلاقی رقم ارگ و هیرمند استفاده کرد. متنوع‌ترین رقم از لحاظ مقاومت به بیماری زنگ زرد، قهوه‌ای و سیاه، رقم ارگ بود. ضمناً آغازگرهای Xgdm116، Xwmc810 و SCS719 دارای بیشترین نقش در تمایز و جداسازی ارقام بودند. در کل نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از نشانگر ریزماهواره‌ای می‌تواند ابزاری مناسب جهت شناسایی ارقام مقاوم و حساس به بیماری زنگ باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از گرنت معاونت پژوهشی دانشگاه زابل با شماره UOZ-GR-9517-31 انجام شده است.

REFERENCES

Abbasi M (2013) New Reports of Rust Fungi for Mycobiota of Iran. Iranian Journal of Plant Pathology. 49(3): 117-118.

Abdollahi Mandoulakani B, Yaniv E, Kalendar R, Raats D, Bariana HS, Bihamta MR, Schulman AH (2015) Development of IRAP- and REMAP-derived SCAR markers for marker-assisted selection of the stripe rust resistance gene Yr15 derived from wild emmer wheat. TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik. 128(2): 211-219. 10.1007/s00122-014-2422-8

Abouzied HM, Eldemery SM, Abdellatif KF (2013) SSR-based genetic diversity assessment in tetraploid and hexaploid wheat populations. British Biotechnology Journal. 3(3): 390-404.

Afshari F (2006) Protein Marker Assisted Identification of Yr9, Lr26 and Sr31 Genes in a Group of Iranian Wheat Cultivars. Journal of Agricultural Science and Technology. 6: 265-268.

Afshari F (2008) Prevalent pathtype of Puccinia striiformis f.sp. tritici in Iran. Journal of Agriculture Science and Technology. 10:67-78.

Agrama H, Tuinstra M (2003) Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. African journal of biotechnology. 2(10): 334-340.

Akbari Moghadam H, Rostami H, Eatesam GR, Kohcan SA, Keikha GA (2004) Introduction Of New Wheat Cultivar, Hamoon In Sistan. Seed and Plant Improvment Journal. 20(4): 543-546. 10.22092/spij.2017.110634

Akfirat FS, Ertugrul F, Hasancebi S, Aydin Y, Akan K, Mert Z, Cakir M, Uncuoglu AA (2013) Chromosomal location of genomic SSR markers associated with yellow rust resistance in Turkish bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of genetics. 92(2): 233-240.

Akfirat FS, Uncuoglu AA (2013) Genetic diversity of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) revealed by SSR markers. Biochemical genetics. 51(3-4): 223-229.

Akkaya M, Buyukunal-Bal E (2004) Assessment of genetic variation of bread wheat varieties using microsatellite markers. Euphytica: Netherlands journal of plant breeding. 135(2): 179-185.

Amini Sefidab A, Vahabzadeh M, Majidi Heravan E, Akbari A, Afyoni D, Saberi MH, Tabatabaee MT, Hajiakhondi Meybodi H, Koohkan SA, Lotfali Ayeneh GA (2012) Arg, A New Bread Wheat Cultivar for Moderate Climate Zones of Iran with Salinity of Soil and Water. Seed and Plant Improvment Journal. 28(4): 724-726.

Anonymous (1997) Balochistan Planning

and Budget Organization, Review of Capabilities and Development Facilities of the Province(ed)^(eds), Natural Resources. pp. 11 pp.

Anonymous (2017) Wheat characteristics based on Iranian hemisphere (second section). (ed)^(eds). Ministry of Agriculture. pp. 13-66.

Arzani A, Ahun-Manesh A, Torabi M (2006a) A study of resistance genetic of adult plants to brown rust in wheat (*Triticum aestevum*). Iranian Journal of Agricultural Science. 2:363-373.

Arzani A, Ahun-Manesh A, Torabi M (2006b) A study of resistance genetic of adult plants to brown rust in wheat (*Triticum aestevum*). Iran Journal of Agricultural science. 2:363-373.

Asghari-Mirk AR, SayedMaasoumi SY, Bihamta MR (2011) Studying of genetic diversity in some wheat cultivar using SSRs marker in dry stress condition. In: Proceedings of the Sixth national congress of new idea in agriculture. Islamic Azad University, Khorasgan.

Asghari A, Babaeizad V, Tajik-Ghanbari MA, Mahdian SA (2013) Molecular Analysis of Two Commercial Wheat Cultivars in Response to Brown Rust Agent *Puccinia triticina* E. Genetic Novin. 2(1): 81-90.

Autrique E, Singh RP, Tanksley SD, Sorrells ME (1995) Molecular marker for four leaf rust resistance genes intro grassed into wheat from wild relatives. Genome. 38:75-83.

Badakhshan H, Mohammadi S, Zad SA, Moghaddam M, Kamali MJ, Khodarahmi M (2008) Quantitative trait loci in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) associated with resistance to stripe rust. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 22(4): 901-906. https://doi.org/10.1080/13102818. 2008.10817575.

Bagherikia S, Karimzadeh G, Naghavi MR (2014) Identification of Wheat Rust Resistance Genes (Lr26, Sr31, Yr9) Using Specific PCR. Crop Biotechnology. 3(5): 129-138.

Bahari Z, Shojaeiyan A, Rashidi Monfared S, Mirshekari A, Nasiri K, Amiriyan M (2015) Investigation of Genetic Diversity among Some Iranian Dill (*Anethum graveolens* L.) Landraces, Using ISSR Markers. Journal of Plant Genetic Research. 2(1): 11-22.

Bakhtiar F, Farshadfar E, Aghaee Sarbarzeh M, Ghazvini H, Afshari F (2015) Study on the presence of yellow and stem rust resistance genes in doubled haploid lines of bread wheat using molecular markers. Crop Biotechnology. 10:41-56.

Bandani A, Mohammadi A, Emam-Jomeh A, Khalaf-Baghi MR (2005) Determine of genetic diversity of native wheat cultivars in sistan using ISJ (Intron Splicing Junction) and RAPD-PCR. In: Proceedings of the 4th Iranian National Biotechnology congress.

Bernardo AN, Bowden RL, Rouse MN, Newcomb MS, Marshall DS, Bai G (2013) Validation of molecular markers for new stem rust resistance genes in US hard winter wheat. Crop Science. 53(3): 755-764.

Bhardwaj S (2017) Growing with wheat and barley rusts for three decades. Chief Editor. 70(1): 22-31.

Bijan Zadeh E, Shokoufa A, Imam Y (2011) Effect of Different Sodium Chloride Levels on Germination Characteristics of 20 Bread Wheat and Macaroni. Iranian Crop Research. 8(2): 277-283. 10.22067/ gsc.v8i2.7525

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American journal of human genetics. 32(3): 314-322.

Browder L (1973) Probable Genotype of

Some *Triticum aestivum* ‘Agent’Derivatives for Reaction to *Puccinia recondita* f. sp. tritici 1. Crop Science. 13(2): 203-206. https://doi.org/10.2135/cropsci1973.0011183X001300020016x

Chen X (2005) Epidemiology and control of stripe rust [*Puccinia striiformis* f. sp. tritici] on wheat. Canadian Journal of Plant Pathology. 27(3): 314-337.

Cherukuri D, Gupta S, Charpe A, Koul S, Prabhu K, Singh R, Haq Q, Chauhan S, Weber W (2003) Identification of a molecular marker linked to an Agropyron elongatum-derived gene Lr19 for leaf rust resistance in wheat. Plant Breeding. 122(3): 204-208.

Dadrezaei ST, Nazari K (2015) Detection of Wheat Rust Resistance Genes in some Iranian Wheat Genotypes by Molecular Markers. Seed and Plant Improvment Journal. 31(1): 163-187.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA minipreparation: version II. Plant molecular biology reporter. 1(4): 19-21. https://doi.org/10.1007/BF02712670

Drikvand R, Bihamta MR, Najafian G, Ebrahimi A (2013) Investigation of genetic diversity among bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) using SSR markers. Journal of Agricultural Science. 5(1): 122-129.

Dubin H, Brennan JP (2009) Combating stem and leaf rust of wheat: Historical perspective, impacts, and lessons learned. Intl Food Policy Res Inst. ISSN.

El-Esawi MA, Witczak J, Abomohra AE-F, Ali HM, Elshikh MS, Ahmad M (2018) Analysis of the Genetic Diversity and Population Structure of Austrian and Belgian Wheat Germplasm within a Regional Context Based on DArT Markers. Genes. 9(1): 47.

Fazeli-nasab B (2012) Ability of microsatellite markers to study genetic diversity of wheat B genome. Technical Journal of Engineering and Applied Sciences. 2(4): 104-106.

Fazeli-Nasab B, Mehrabi AA, Izadi-Darbandi A (2010) Genetic diversity of wheat storage proteins and SSRs markers. Modern Genetics. 5(2): 81-93.

Guo Z-H, Fu K-X, Zhang X-Q, Bai S-Q, Fan Y, Peng Y, Huang L-K, Yan Y-H, Liu W, Ma X (2014) Molecular insights into the genetic diversity of Hemarthria compressa germplasm collections native to southwest China. Molecules. 19(12): 21541-21559.

Gupta SK, Charpe A, Koul S, Prabhu KV, Haq QMR (2005) Development and validation of molecular markers linked to an Aegilops umbellulata–derived leaf-rust-resistance gene, Lr9, for marker-assisted selection in bread wheat. Genome. 48(5): 823-830. https://doi.org/10.1139/g05-051

Hallajian MT, Kehsvarzi M, Bagheri A, Afshari F, Rodbar-Kalari F, Khodarahmi M (2007) QTL mapping of yellow rust resistance genes in wheat using RAPD and RGA molecular markers In: Proceedings of the Fifth National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran.

Hayden M, Kuchel H, Chalmers K (2004) Sequence tagged microsatellites for the Xgwm533 locus provide new diagnostic markers to select for the presence of stem rust resistance gene Sr2 in bread wheat (Triticum aestivum L.). Theoretical and Applied Genetics. 109(8): 1641-1647.

Hiebert C, Thomas J, McCallum B (2005) Locating the broad-spectrum wheat leaf rust resistance gene Lr52 (LrW) to chromosome 5B by a new cytogenetic method. Theoretical and Applied Genetics. 110(8): 1453-1457.

Jamalirad S, Mohammadi S, Toorchi M (2012) Assessing genetic diversity in a set of wheat (*Triticum aestivum*) genotypes using microsatellite markers to improve the yellow rust

resistant breeding programs. African Journal of Agricultural Research. 7(48): 6447-6455.

Khaled A, Motawea M, Said A (2015) Identification of ISSR and RAPD markers linked to yield traits in bread wheat under normal and drought conditions. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 13(2): 243-252.

Khan H, Bhardwaj S, Gangwar O, Prasad P, Kashyap P, Savadi S, Kumar S, Rathore R (2017) Identifying some additional rust resistance genes in Indian wheat varieties using robust markers. Cereal Research Communications. 45(4): 633-646.

Khan MK, Pandey A, Thomas G, Akkaya MS, Kayis SA, Ozsensoy Y, Hamurcu M, Gezgin S, Topal A, Hakki EE (2015) Genetic diversity and population structure of wheat in India and Turkey. AoB PLANTS. 7(plv083. 10.1093/aobpla/plv083.

Kuleung C, Baenziger P, Kachman S, Dweikat I (2006) Evaluating the genetic diversity of triticale with wheat and rye SSR markers. Crop Science. 46(4): 1692-1700.

Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. In: Evolutionary biology. (ed)^(eds). Springer. pp. 381-398.

Loegering W, Browder L (1971) system of nomenclature of physiologic races of *Puccinia recondita* tritici. Plant disease reporter. 55:719-722.

McCartney CA, Somers DJ, McCallum BD, Thomas J, Humphreys DG, Menzies JG, Brown PD (2004) Microsatellite tagging of the leaf rust resistance gene *Lr*16 on wheat chromosome 2B. Molecular Breeding. 15:329-337.

McIntosh RA, Dubcovsky J, Rogers WJ, Morris C, Xia XC (2017) Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2017 Supplement. In: KOMUGI–Integrated Wheat Science Database(ed)^(eds). http://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2017.pdf.

McIntosh RA, Wellings CR, Park RF (1995) Wheat rusts: an atlas of resistance genes. CSIRO Publications, Victoria, Australia. 250 p, ISSN,

Mesterházy Á (1989) The Wheat Rusts-Breeding for Resistance (Monograph on Theoretical and Applied Genetics, Vol. 12)(ed)^(eds). JSTOR.

Mir-Drikvand R, Khyrolahi A, Ebrahimi A, Rezvani M (2015) Study of Genetic Diversity Among Some Rainfed Bread and Durum Wheat Genotypes, Using SSR Markers. Journal of Plant Genetic Research. 2(1): 35-44.

Mirzania M, Darvishnia M, Ahmadi H, Ghoudarzi D, Nasrolahi M (2015) Study of resistance components at seedling stage to leaf rust (*Puccinia triticina* Eriksson) in some commercial cultivars. Iranian Journal of Plant Pathology. 51(2): 263-267.

Mohammadi S, Prasanna B (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. Crop Science. 43(4): 1235-1248.

Mollaheydari Bafghi R, Baghizadeh A, Mohammadi-Nejad G, Nakhoda B (2014) Assessment of genetic diversity in Iranian wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and lines using microsatellite markers. Journal of Plant Molecular Breeding. 2(1): 74-89.

Moradkhani H, Aboughadareh AP, Mehrabi AA, Etminan AA (2012) Evaluation of genetic relationships of *Triticum-Aegilops* species possessing D genome in different ploidy levels using microsatellites. International Journal of Agriculture and Crop Science. 23:1746-1751.

Moradkhani H, Mehrabi AA, Etminan A, Pour-Aboughadareh A (2015) Molecular diversity and phylogeny of Triticum-Aegilops species possessing

D genome revealed by SSR and ISSR markers. Plant Breeding and Seed Science. 71(1): 81-95.

Nagella P, Murthy HN (2014) Production of Withanolides from Cell and Organ Cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. 285-315. 10.1007/978-94-017-9223-3_12

Naji AM, Moghaddam M, Ghaffari MR, Irandoost HP, Farsad LK, Pirseyedi SM, Mohammadi SA, Ghareyazie B, Mardi M (2008) Validation of EST-derived STS markers localized on Qfhs. ndsu-3BS for Fusarium head blight resistance in wheat using a 'Wangshuibai'derived population. Journal of Genetics and Genomics. 35(10): 625-629. https://doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60083-1

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences. 70(12): 3321-3323.

Nei M, Li W-H (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences. 76(10): 5269-5273.

Omrani A, Khodarahmi M, Afshari F (2011) Study on resistance of wheat commercial cultivars to yellow rust to some isolates (*Puccinia striiformis* f.sp. tritici) from different regions of Iran. Journal of Agronomy and Plant Breeding. 7(1): 55-68.

Pal D, Bhardwaj S, Sharma D, Kumari S, Patial M, Sharma P (2015) Assessment of genetic diversity and validating rust resistance gene sources using molecular markers in wheat (*Triticum aestivum* L.). SABRAO Journal of Breeding & Genetics. 47(2): 89-98.

Pezhmanmehr M, Hassani ME, Tabatabaie SMF, Hadian J (2009) Genetic diversity and segregating of populations of *Bunium persicum* Boiss using molecular markers RAPD. Journal of Environmental Sciences. 7(2): 63-76.

Prasad M, Varshney R, Roy J, Balyan H, Gupta P (2000) The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. Theoretical and Applied Genetics. 100(3-4): 584-592.

Prins R, Groenewald J, Marais G, Snape J, Koebner R (2001a) AFLP and STS tagging of Lr19, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. Theoretical and Applied Genetics. 103(4): 618-624.

Prins R, Groenewald JZ, Marais GF, Snape JW, Koebner RMD (2001b) AFLP and STS tagging of Lr19, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. Theoretical and Applied Genetics. 103:618-624.

Rajaram S, Singh RP, Torres E (1988) Current CIMMYT approaches in breeding wheat for Rust Resistance. pp. 101-118. In: N.W. Simmonds and S. Rajaram (Eds.), Breeding Strategies for Resistance to the Rusts of Wheat. CIMMYT, Mexico. 154 p, ISSN,

Rajaram S, Singh RP, Van Ginkel M (1996) Approaches to breed wheat for wide adaptation, rust resistance and drought. pp. 2-30. In: Proceedings of the Eight Assembly Wheat Breeding Society of Australia. The Australian National University, Canberra, ACT. 422 p, ISSN,

Rao VR, Hodgkin T (2002) Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. Plant cell, tissue and organ culture. 68(1): 1-19.

Rauf S, Teixeira da Silva J, Khan AA, Naveed A (2010) Consequences of plant breeding on genetic diversity. International Journal of plant breeding. 4(1): 1-21.

Roder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier M-H, Leroy P, Ganal MW (1998) A microsatellite map of

wheat. Genetics. 149(4): 2007-2023.

Roder MS, Plaschke J, König SU, Börner A, Sorrells ME, Tanksley SD, Ganal MW (1995) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. Molecular and General Genetics MGG. 246(3): 327-333.

Roelfs AP, Singh RP, Saari EE (1992) Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management. Mexico, D.F.: CIMMYT. 81, ISSN,

Rolf FJ (2002) NTSYS-Pc: Reference Manual. Exeter publishing Ltd New York.

Saeeidi A (2005) Characteristics of wheat bread, durum wheat, barley, triticale and rye introduced by the cereal sector (1930-2003). Agricultural education publication, Karaj. pp 356, ISSN,

Saini R (1993) Diversity for resistance to leaf rust in Triticum aestivum. Plant disease (USA). 77:359-363.

Salem KF, Röder MS, Börner A (2015) Assessing genetic diversity of Egyptian hexaploid wheat (Triticum aestivum L.) using microsatellite markers. Genetic resources and crop evolution. 62(3): 377-385.

Sarani M, Rezvani Moghaddam P, Nasiri Mahallati M, Zand A (2011) Investigation of some morphological characteristics effective in increasing the competitive strength of wheat (*Trticum aestivum*) in competition with Bromus weed (*Bromus japonicus*). Plant Protection Studies. 25(2): 127-135. 10.22067 / jpp.v25i2.10099

Sardouie Nasab S, Mohammadi Nejad G, Nakhoda B (2013) Assessing genetic diversity of promising wheat (*Triticum aestivum* L.) lines using microsatellite markers linked with salinity tolerance. Journal of Plant Molecular Breeding. 1(2): 28-39.

Shafie A, Maleki Zanjani B, Karami S, Imani Khah F (2010) Detection of leaf rust resistance gene Lr32 in Iranian wheat varieties and lines using infection-type data test and molecular markers linked to the Lr32. Journal of Plant Production. 17(3): 21-37.

Sharma RC, Nazari K, Amanov A, Ziyaev Z, Jalilov AU (2016) Reduction of winter wheat yield losses caused by stripe rust through fungicide management. Journal of Phytopathology. 164(9): 671-677. https://doi.org/10.1111/jph.12490

Sofalian O, Salmani-Samadi R, Asghari A, Shekarpour M, Sedghi M, Firouzi B, Ahmadpour F (2013) evaluation of salt tolerance in different wheat cultivars and its association with molecular merkers. Journal of Applied Crop Breeding. 1(2): 161-174.

Spielmeyer W, Sharp P, Lagudah E (2003) Identification and validation of markers linked to broad-spectrum stem rust resistance gene Sr2 in wheat (Triticum aestivum L.). Crop Science. 43(1): 333-336.

Spii (. 2015) Introduce of Agronomical Cultivars (safty and Security of Food (Section 1) provided by (Seed and Plant Improvement Research Institute (SPII)). Agricultural Research, Education and Promotion Organization, Karaj. 238 p, ISSN,

Statler G (1984) Probable Genes for Leaf Rust Resistance in Several Hard Red Spring Wheats 1. Crop Science. 24(5): 883-886. https://doi.org/10.2135/cropsci1984.0011183X002400050013x

Stubbs R (1985) Stripe rust. In ‘Cereal rusts. Vol. II. Disease, distribution, epidemiology, and control’.(Eds AP Roelfs, WR Bushnell) pp. 61–101(ed)^(eds). Academic Press: New York.

Sumathi M, Ramasamy Y (2017) Microsatellite allele length variations in inter-specific hybrids of Eucalyptus. Acta Botanica Croatica. 76(1): 103-106.

Sun X, Bai G, Carver BF (2009) Molecular markers for wheat leaf rust

resistance gene Lr41. Molecular breeding. 23(2): 311-321. 10.1007/s11032-008-9237-8

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution. 28(10): 2731-2739. doi: 10.1093/molbev/msr121

Tarinejad A (2013) Studies on genetic diversity between and within six wheat populations using ISSR markers. Research on Crops. 14(1): 37-41.

Vikal Y, Chhuneja R, Singh R, Dhaliwal HS (2004) Tagging of an Aegilops speltoides Derived Leaf Rust Resistance Gene Lr28 with a microsatellite marker in wheat. Plant Biochemistry and Biotechnology. 13: 47-49.

Wang H, Wang Xe, Chen P, Liu D (2007) Assessment of genetic diversity of Yunnan, Tibetan, and Xinjiang wheat using SSR markers. Journal of Genetics and Genomics. 34(7): 623-633.

Weng Y, Azhaguvel P, Devkota R, Rudd J (2007) PCR-based markers for detection of different sources of 1AL. 1RS and 1BL. 1RS wheat–rye translocations in wheat background. Plant Breeding. 126(5): 482-486. https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01331.x

Xing L, Yang Wx, Li Yn, Liu Dq, Yan Hf, Meng Q-f, Zhang T (2006) A SSR Marker for Leaf Rust Resistance Gene Lr19 in Wheat. Agricultural Sciences in China. 5(2): 111-115.

Yang MN, Xu ZB, Wang MN, Song JR, Jing JX, Li ZQ (2008) Inheritance and molecular mapping of stripe rust resistance gene Yr88375 in Chinese wheat line Zhongliang 88375. Agricultural Sciences in China. 7(8): 901-906.

Yediay FE, Baloch FS, Kilian B, Özkan H (2010) Testing of rye-specific markers located on 1RS chromosome and distribution of 1AL. RS and 1BL. RS translocations in Turkish wheat (*Triticum aestivum* L., *T. durum* Desf.) varieties and landraces. Genetic resources and crop evolution. 57(1): 119-129. https://doi.org/10.1007/s10722-009-9456-9

Zakeri A, Yassaie M, Afshari F, Rajaee S, Nikzad AR (2017) Surveying virulence of the causal agent of wheat stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. tritici) and determining reaction of commercial wheat cultivars over the past decade in Fars, Iran. Iranian Journal of Plant Pathology. 52(3): 297-316.

Ziyaev Z, Sharma R, Nazari K, Morgounov A, Amanov A, Ziyadullaev Z, Khalikulov Z, Alikulov S (2011) Improving wheat stripe rust resistance in Central Asia and the Caucasus. Euphytica: Netherlands journal of plant breeding. 179(1): 197-207.