ISSN: 2676-7309

Plant Genetic Researches

Volume 11, Issue 1 (2024)

Lorestan University

Research Article

http://dx.doi.org/10.22034/PGR.11.1.5

Introducing Two Stripe Rust Resistance Genes, *Yr5* and *Yr15* to Some Iranian Bread Wheat Cultivars Using Marker-Assisted Backcrossing

Fatemeh Bagherzadeh[1], Hannaneh Mirahmadi[1], Soraya Pourtabrizi[2,*], Ali Kazemipour[3], Maryam Dorraninejad[2] and Roohollah Abdoshahi[4]

1- M.Sc. Student, Department of Plant Production and Genetics, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
2- Ph.D., Department of Plant Production and Genetics, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
3- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
4- Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

[*]***Corresponding author*** ✉: *s.pourtabrizi@empl.uk.ac.ir*

Citation: **Bagherzadeh, F., Mirahmadi, H., Pourtabrizi, S., Kazemipour, A., Dorraninejad, M. and Abdoshahi, R.** (2024). Introducing two stripe rust resistance genes, *Yr5* and *Yr15*, to some Iranian bread wheat cultivars using marker-assisted backcrossing. *Plant Genetic Researches*, **11(1):** 77-88. http://dx.doi.org/10.22034/PGR.11.1.5

(Received: June 4, 2024; Final Revised: August 9, 2024; Accepted: August 20, 2024; Published online: September 21, 2024)

Extended abstract

Introduction

Stripe (yellow) rust, caused *by Puccinia striiformis f. sp. tritici* (*Pst*), is among the most important foliar diseases of wheat, posing a persistent threat to the production of such a strategic crop in many regions worldwide. In 1993 alone, the damage caused by stripe rust in Iran was estimated at 1.5 million tons, representing approximately 15% of total wheat production during that period. Despite having a positive effect on controlling the yellow rust disease, application of fungicides pose many economic costs and environmental issues. To this end, the use of disease-resistant cultivars is known as the most reliable and cost-effective way to prevent the damage inflicted by *P. striiformis*. By using different resistant cultivars and reducing the life cycles of *P. striiformis*, the casual agent of strip rust disease, the genetic diversity of such a disease can be effectively reduced. To date, 80 resistance genes against yellow rust have been identified, among which *Yr5* and *Yr15* stand out as highly effective and durable genes conferring whole-plant resistance. *Yr5* and *Yr15* are recognized as durable resistance genes, whereas the resistance conferred by other genes has been overcome in the past. Pyramiding such genes can be an effective approach to improve resistant cultivars to yellow rust disease. Marker-assisted selection (MAS), a revolutionary approach, has demonstrated that breeders can directly select alleles without relying on phenotypic evaluation. Although it never replaced phenotype and conventional selection methods, MAS currently plays an important role in introgression through backcrossing, gene pyramiding, and line development in wheat breeding programs. The aim of this research was to introduce two durable yellow rust resistance genes, *Yr5* and *Yr15*, to six Iranian cultivars using marker-assisted backcrossing.

Materials and methods

This research was conducted in the research farm of Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Two resistant standard lines, including *Yr15/6**Avocet'S' and *Yr5/6**Avocet'S', and six Iranian cultivars namely Baharan, Rakhshan, Setara, Sivand, Parsi and Amin were planted in the research field. Each cultivar (recurrent parent) was crossed with both standard lines (as donor parents) in the separate crossing programs. With the ultimate

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

goal of pyramiding specific resistance genes, *Yr5* and *Yr15*, the aim of this resarch was to introduce resistance genes from the standard lines *Yr15/6**Avocet'S' and *Yr5/6**Avocet'S' to Baharan, Rakhshan, Setare, Sivand, Parsi and Amin cultivars using marker assisted backcrossing. Ten plants from each recipient cultivar were crossed with standard lines to obtain F_1 generations. As the F_1 generation was heterozygous, the marker-assisted selection was not required. F_1 seeds were cultivated in the field and crossed with recurrent parents to develope the BC_1F_1 generation. To select heterozygous plants using marker-assisted selection, 30 plants were randomely selected, leaf samples were collected and DNA extraction was done using Zhang's method. *KASP Yr5* and *Xbarc80* molecular markers were used to check the presence or absence of *Yr5* and *Yr15* genes, respectively.

Results and discussion

The most durable whole plant resistance genes to yellow rust, *Yr5* and *Yr15*, were introduced from standard lines to six Iranian bread wheat cultivars using marker-assisted backcrossing. As to the *Yr15* gene, the resistant and susceptable alleles had PCR band of 1355 bp and 447 bp, respectively. The genotypes showing the1355 bp PCR fragment were selected and baccrossed to six Iranian bread wheat cultivars to develop backcross generations. For the *Yr15* gene, the susceptible allele may either produce a PCR fragment of 447 bp or no fragment at all. In the present study, the susceptible cultivars did not exhibit any band corresponding to the susceptible allele. For the *Yr5* gene, the resistant and susceptable alleles had the PCR fragment of 858 bp and 83 bp size, respectively. The genotypes with the PCR fragemnt of 858 bp were selected and backcrossed to six Iranian bread wheat cultivars to develop backcross generations. The results of molecular studies indicated the successful introduction of both *Yr5* and *Yr15* genes to all six Iranian cultivars.

Conclusions

Whole-plant resistance genes may encounter challenges that compromise their effectiveness over time, potentially leading to eventual breakdown of resistance. In Australia and Europe, breaking the resistance of Yr5 and Yr15 genes increases the probability of this happening in Iran, but the pyramiding of these two genes can create effective and durable resistance. In addition, breeding new lines harboring the rust resistance genes through backcrossing is a way to develop wheat cultivars with favorable agronomic traits and durable resistance. The pyramiding of *Yr5* and *Yr15* not only helps prevent yield losses during epidemic outbreaks and provides durable resistance but also offers significant environmental benefits to wheat breeding programs.

Keywords: Back cross, Durable resistance, Major genes, Resistance genes, Specific marker

پژوهش‌های ژنتیک گیاهی
جلد ۱۱، شماره ۱، ۱۴۰۳
شاپا الکترونیکی: ۷۳۰۹-۲۶۷۶
دانشگاه لرستان
مقاله پژوهشی
http://dx.doi.org/10.22034/PGR.10.1.5

انتقال دو ژن مقاومت *Yr5* و *Yr15* به برخی از ارقام ایرانی گندم نان با استفاده از تلاقی برگشتی به کمک نشانگر

فاطمه باقرزاده[۱]، حنانه میراحمدی[۱]، ثریا پورتبریزی[۲*]، علی کاظمی پور[۳]، مریم درانی‌نژاد[۲] و روح‌اله عبدالشاهی[٤]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان
۲- دکتری تخصصی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان
۳- استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان
٤- دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان

(تاریخ دریافت: ۱٤۰۳/۰۳/۱۵ ؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱٤۰۳/۰۵/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۳/۰۵/۳۰؛ تاریخ انتشار برخط: ۱٤۰۳/۰٦/۳۱)

چکیده

زنگ نواری (زرد)، با عامل قارچی *Puccinia striiformis f. sp. tritici* (*Pst*) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم در اغلب نقاط دنیا به‌حساب می‌آید. بهترین روش مقابله با این بیماری، ایجاد مقاومت ژنتیکی است. عامل این بیماری خیلی سریع تکامل پیدا می‌کند و به‌همین دلیل مقاومت ناشی از ژن‌های بزرگ اثر شناسایی شده برای مقاومت، شکسته شده است. در این پژوهش ژن‌های *Yr5* و *Yr15* که مؤثرترین ژن‌های مقاومت در مرحله گیاهچه‌ای هستند، با استفاده از روش تلاقی برگشتی به‌کمک نشانگر به ارقام ایرانی بهاران، رخشان، ستاره، سیوند، پارسی و امین منتقل شدند. شش پروژه به‌نژادی جداگانه برای انتقال این ژن‌ها به ارقام یاد شده انجام شد. هر رقم با لاین‌های استاندارد *Yr*15/6*Avocet'S' و *Yr*5/6*Avocet'S' (والدهای بخشنده) تلاقی داده شد. نتاج نسل اول (F_1) 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 و تلاقی برگشتی دوم صورت گرفت. به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که در هر جمعیت لاین مقاوم در برابر زنگ نواری را می‌توان با تکرار چند نسل تلاقی برگشتی و یک نسل خودگشنی، ایجاد کرد. انتقال ژن‌های مقاومت به زنگ زرد و هرمی کردن آن‌ها در ارقام مورد بررسی علاوه بر افزایش احتمال ممانعت از کاهش عملکرد در سال‌های اپیدمی این بیماری و ایجاد مقاومت پایدار، از لحاظ زیست محیطی نیز اثرات مطلوبی خواهد داشت.

واژگان کلیدی: تلاقی برگشتی، ژن‌های بزرگ‌اثر، ژن‌های مقاومت، مقاومت پایدار، نشانگر اختصاصی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: s.pourtabrizi@empl.uk.ac.ir

مقدمه

زنگ نواری با عامل *Puccinia striiformis f. sp. tritici* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های برگی گندم با دامنه گسترش وسیع، همواره تولید این محصول راهبردی را تهدید کرده است و به‌طور متوسط منجر به کاهش عملکرد بین ۱۰ تا ۷۰ درصد شده است (Khanmakoo *et al.*, 2019; Chen, 2005). با توجه به شیوع این بیماری در شرایط دمایی ۱۵-۲ درجه سانتی‌گراد در مناطق مرتفع و عرض‌های شمالی‌تر و نیز افزایش همه‌گیری آن در سال‌های خنک و مرطوب (Singh *et al.*, 2005)، گسترش آن در ایران دور از انتظار نیست. براساس گزارش‌های موجود، در چین در سال ۲۰۰۷، بیش از ۲۰ میلیون هکتار گندم تحت تأثیر زنگ زرد گندم قرار گرفت (Wan *et al.*, 2007). این بیماری در طی ۱۲ سال منجر به از دست رفتن ۶۰ درصد عملکرد گندم در تاجیکستان شد (Ziyaev *et al.*, 2011). میزان خسارت این بیماری در ایران، در سال ۱۳۷۲ حدود۱/۵میلیون تن برآورد شده است که معادل ۱۵درصد کل گندم تولید کشور در آن سال‌ها است (Torabi *et al.*, 1995). مطالعات اخیر نشان می‌دهند که خسارت ناشی از زنگ‌های گندم در جهان سالانه معادل ۲/۹ میلیارد دلار آمریکا است (Huerta-Espino *et al.*, 2020). قارچ‌کش‌ها برخلاف تأثیر مثبتی که در کنترل زنگ زرد دارند، به‌دلیل هزینه‌های اقتصادی و مشکلات زیست‌محیطی، جای خود را به ارقام مقاوم به‌عنوان مطمئن‌ترین و به‌صرفه‌ترین روش جلوگیری از خسارت زنگ‌ها داده‌اند (Chen, 2005). با استفاده از ارقام مقاوم مختلف و کاهش چرخه‌های زندگی قارچ عامل بیماری زنگ می‌توان تا حد زیادی از تنوع ژنتیکی این عامل کاست (Ebrahimi *et al.*, 2024; Omrani *et al.*, 2016). گزارش‌ها نشان می‌دهد تا کنون ۸۰ ژن مقاومت به زنگ زرد شناسایی شده است (Rosewarne *et al.*, 2013). از این بین ژن‌های *Yr5* و *Yr15* مقاومت کامل نسبت به همه‌ی نژادهای موجود در کالیفرنیا داشته‌اند و در زمره‌ی ژن‌های مقاومت در مرحله گیاهچه‌ای هستند که تا کنون شناخته شده‌اند (Marchal *et al.*, 2018). این در حالی است که مقاومت سایر ژن‌های مقاومت، توسط نژادهای زنگ شکسته شده است. پژوهشگران از ترکیب ژنی *Yr5+Yr15* برای ایجاد مقاومت استفاده کرده‌اند و معتقدند زنگ زرد توانایی غلبه بر هر کدام از این ژن‌ها را به صورت جداگانه داراست (Marchal *et al.*, 2018). این نوع مقاومت به زنگ زرد در واقع مقاومت نژاد اختصاصی است که به‌دلیل خلق نژاد جدید بیمارگر عمر کوتاهی دارد و شکسته می‌شود (Huerta-Espino *et al.*,2020).

ژن *Yr5* که اولین بار در رقم Album شناسایی شده است، به‌دلیل عدم استفاده‌ی گسترده در برنامه‌های به‌نژادی هم‌چنان در برابر زنگ زرد مقاومت ایجاد می‌نماید (Wellings *et al.*, 2012). هر چند گزارش‌ها نشان می‌دهد نژاد زنگ زرد AU85569 در استرالیا توانسته است مقاومت این ژن را بشکند (Wellings, 2007).

ژن Yr15 نیز که در سال ۱۹۸۹ در گونه *Triticum dicoccoides* شناسایی شد، علی‌رغم مقاومت در برابر طیف گسترده‌ای از نژادهای زنگ زرد، مقاومت خود را در برابر نژاد DK92/02 در اروپا از دست داد (Hovmoller and Justesen, 2007). بررسی مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که تمرکز محققین، پی‌بردن به وجود یک ژن مقاومت در ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی بوده است. این در حالی است که وجود مقاومت تک‌ژنی مسئله ایجاد مقاومت پایدار را با مشکل مواجه می‌سازد (Omrani *et al.*, 2016). به عبارتی هرمی کردن ژن‌ها روش مؤثری برای ایجاد مقاومت به بیماری زنگ زرد است (Aktar-Uz-Zaman *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020). انتخاب به کمک نشانگر به‌عنوان یک ایده انقلابی نشان داد که به‌نژادگران می‌توانند مستقیماً از 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 به‌کار 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 فراهم می‌سازد 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;). 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 به‌عنوان تلاقی برگشتی به کمک نشانگر شناخته می‌شود، کارایی آلل‌هایی در تلاقی برگشتی را که مغلوب، اپیستاتیک یا تأثیرگذار هستند، ولی نمی‌توان آن‌ها را به‌راحتی بر روی یک گیاه واحد اندازه‌گیری کرد، بسیار بهبود بخشید. نتایج برخی از مطالعات مشخص نمود که 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 می‌گردد. علاوه‌براین با پیشرفت نسل‌ها، بخش زیادی از ژنوم والد تکراری بازیابی می‌شود و بخش‌های کمی از ژنوم والدین بخشنده باقی می‌ماند (Hospital *et al*., 1997). 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 به‌طور مؤثر در یک زمینه ژنتیکی تسهیل کند (Joshi and Nayak 2010).

از سوی دیگر توالی‌یابی و توسعه نشانگرهای مولکولی اختصاصی، مشکلات اجرایی و زمان‌بر بودن این روش را به‌خوبی برطرف کرده است. علاوه‌بر این، ژن‌های *Yr5* و *Yr15* به‌دلیل قابلیت اعطای مقاومت پایدار در کنار هم، در بین مهم‌ترین ژن‌های منتخب برای هرمی کردن ژن‌های مقاومت به زنگ زرد قرار دارند (Klymiuk *et al*., 2018; Qie *et al*., 2019; Wang *et al*., 2023). از این رو، هدف این پژوهش انتقال این ژن‌ها از لاین‌های استاندارد به ارقام گندم ایرانی بهاران، رخشان، ستاره، سیوند، پارسی و امین با استفاده از روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگر و هرمی کردن این دو ژن در برخی از این ارقام است. سعی شده است که با ایجاد مقاومت به زنگ زرد در ارقام ذکر شده در سال‌های همه‌گیری این بیماری از خسارت محصول پیشگیری شود.

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 به‌عنوان والد بخشنده (لاین‌های استاندارد *Yr*15/6*Avocet'S' و *Yr*5/6*Avocet'S') و ارقام ایرانی بهاران، رخشان، ستاره، سیوند، پارسی و امین به‌عنوان والدین گیرنده (تکراری)، به‌صورت دستی در شش پروژه به‌نژادی تلاقی برگشتی به کمک نشانگر مجزا انجام شد. فاصله بین ردیف‌ها ۴۰ سانتی‌متر و فاصله روی ردیف‌ها ۲۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. بذور به‌صورت خطی در عمق ۵-۴ سانتی‌متری کشت شدند. عملیات دورگ‌گیری در طول پروژه شامل انتخاب پایه مادری مناسب، اخته نمودن سنبله مادری، آماده نمودن پایه پدری جهت گرده‌افشانی و گرده‌افشانی بود.

در راستای هدف نهایی، یعنی هرمی کردن ژن‌های مقاومت اختصاصی *Yr*5 و *Yr*15، در این بخش از پژوهش، انتقال ژن‌های مقاومت از لاین‌های استاندارد *Yr*15/6*Avocet'S' و *Yr*5/6*Avocet'S' به ارقام بهاران، رخشان، ستاره، سیوند، پارسی و امین با استفاده از روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگر صورت گرفته است.

رقم بهاران مناسب کشت در مناطق معتدلِ مواجه با تنش رطوبتی آخر فصل و مقاوم به خوابیدگی است (Barzegari *et al*., 2020; Jalili *et al*., 2023). 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 (Eskandari Torbeghan *et al*., 2023). رقم ستاره با متوسط ارتفاع ۷۴ سانتی‌متر، زودرس و بهاره است (Rezaie *et al*., 2022). مقاومت به ریزش و زودرسی از ویژگی‌های برجسته رقم سیوند می‌باشد (Aghaei *et al*., 2017). رقم پارسی و امین هم با کیفیت نانوایی خوب، برای کشت در مزارع آبی مناطق معتدل ایران پیشنهاد شده‌اند

(Najafiyan *et al.*, 2010). همه این ارقام برخلاف خصوصیات مثبت، پتانسیل مقاومت مطلوب در برابر زنگ را ندارند.
ده بوته از هریک از ارقام بهاران، رخشان، ستاره، سیوند، پارسی و امین با لاین‌های استاندارد *Yr*15/6*Avocet'S' و *Yr*5/6*Avocet'S' (که به‌ترتیب دارای ژن مقاومت *Yr*15و *Yr*5 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 هتروزیگوت به کمک نشانگر، در هر یک از جمعیت‌های حاصل از تلاقی برگشتی اول که بین لاین‌های استاندارد*Yr*15/6*Avocet'S'، *Yr*5/6*Avocet'S' و ارقام بهاران، رخشان، ستاره، سیوند، پارسی و امین 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 ژل آگارز–الکتروفورز ارزیابی شد. برای بررسی حضور یا عدم حضور ژن *Yr*5 از نشانگر مولکولی *Yr5* KASP استفاده شد(Marchal *et al.*, 2018). هم‌بارز بودن این نشانگر و تولید باندهای واضح و قابل نمره‌دهی، به اضافه سهولت کار با آن به‌دلیل تفاوت 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 ۸۵۸ جفت‌باز و آلل حساسیت با اندازه ۸۳ جفت‌باز روی ژل آگارز مشاهده می‌شوند. نشانگر مولکولی برای شناسایی ژن *Yr*15 با آغازگری به نام *Xbarc8* تکثیر شد. آلل پیوسته با مقاومت در این نشانگر با اندازه ۱۳۵۵جفت‌باز و آلل حساسیت با اندازه ٤٤٧ جفت‌باز و یا بدون باند، تکثیر می‌گردند (Klymiuk *et al.*, 2018). 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 DNA در دستگاه گرادیان (Biometra Tone, Analytik Jena, Germany) انجام شد. کلیه آزمایش‌های مولکولی در طول پروژه جهت اطمینان از تکرارپذیری، دو بار تکرار شدند.

جدول ۱- توالی آغازگرها برای تکثیر ژن‌های *Yr5* و *Yr15*

Table 1. Primers sequences for *Yr5* and *Yr15 genes* amplification

نام ژن Gene name	نوع مقاومت Resistance type	توالی آغازگر Primer sequence (5´-3´)	منبع Reference
*Yr*5	مقاومت گیاهچه‌ای Seedling resistance	F: ATGTCGAAATATTGCATAACATGG R: CTAGCAATCAAACAAGCTAAATA	Marchal *et al.*, (2018)
*Yr*15	مقاومت گیاهچه‌ای Seedling resistance	F: CTGCTCACTTTTTGCCTGTG R: AAAAGTTGTTGCTCTGCTTTT	Klymiuk *et al.*, (2018)

جدول ۲- چرخه دمایی مراحل مختلف واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

Table 2. PCR cycles temperatures for Polymerase Chain Reaction

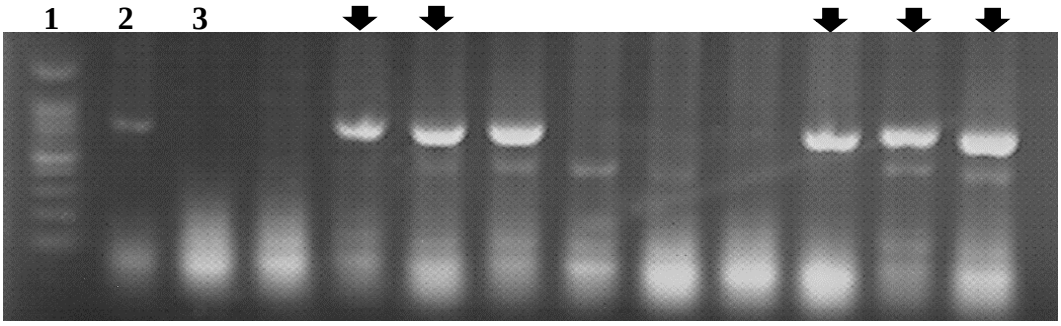
نام ژن Gene name	Temperature (°C) دما (درجه سانتی‌گراد) Time زمان	واسرشت‌سازی اولیه Initial denaturation	واسرشت‌سازی Denaturation	اتصال آغازگر Annealing	بسط extension	بسط نهایی Final extension
*Yr*5	دما (°C) زمان	94 2min	94 30 sec	50.9 30 sec	72 30 sec	72 45 sec
*Yr*15	دما (°C) زمان	94 3 min	94 30 sec	53.5 30 sec	72 30 sec	72 45 sec

تعـداد سیکل‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای این ژن‌ها به ترتیب ۳۸ و ۳۶ بود. در ادامه محصولات به‌دست آمده روی ژل آگارز یک درصد با استفاده از بافر TBE:0.5× جداسازی 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 ۳۰ بوته تصادفی توسط نشانگر اختصاصی در هر یک از جمعیت‌های حاصل از تلاقی برگشتی اول، دو نـوع ژنوتیپ هموزیگوت حساس و هتروزیگوت دارای ژن مقاومت مشاهده شد. به این ترتیب که در جمعیت‌های تلاقی برگشتی اول برای ژن *Yr*5، ژنوتیپ دارای تک‌باند حساسیت در گروه هموزیگوت حساس و ژنوتیپ دارای دو باند حساسیت و مقاومت در گروه هتروزیگوت دارای ژن مقاومت قرار گرفت. در جمعیت‌های تلاقی برگشتی اول برای ژن *Yr*15 نیز نتاجی که باند مقاومت را نشان می‌دهند برای تلاقی برگشتی انتخاب شدند (در رابطه با رقم‌های مورد بررسی، آلل حساس بدون باند بود). تلاقی بین تمام بوته‌های هتروزیگوت دارای هر یک از ژن‌های مقاومت *Yr*5 و *Yr*15 انتخاب شده و والدهای تکراری، برای دستیابی به نسل BC_2F_1 صورت گرفت (در این نسل سهم ژنتیکی والدین تکراری۸۷/۵ درصد است).

نتایج و بحث

تلاقی برگشتی به کمک نشانگر ژن *Yr*5: نشانگرهای اختصاصی‌این ژن که یکی از پایدارترین ژن‌های مقاومت در مرحله گیاهچه‌ای است، در سال ۲۰۱۸ شناسایی شد (Marchal *et al.*, 2018). در برنامه به‌نژادی گندم دانشگاه شهید باهنر کرمان با روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگر، این ژن به ارقام گندم نان ایرانی بهاران، رخشان، ستاره، سیوند، پارسی و امین منتقل شد. در این پژوهش، تکثیر باندی با طول **۸۵۸** جفت‌باز در رقم *Yr*5/6*Avocet'S' به‌عنوان والد بخشنده و باندی به طول **۸۳** جفت‌باز در ارقام بهاران، رخشان، ستاره، سیوند، پارسی و امین، به‌ترتیب حضور آلل‌های مقاومت و حساسیت به زنگ نواری را تأیید کرد (Marchal *et al.*, 2018). از این تنوع ژنتیکی در گزینش و رسیدن به ژنوتیپ‌های هتروزیگوت حاصل از تلاقی برگشتی اول استفاده شد. همان‌گونه که در شکل ۱ مشخص است، برخلاف حضور باند آلل حساسیت در تمامی نتاج، تنها برخی از نتاج هر دو باند آلل حساسیت و مقاومت را دارا هستند (هتروزیگوت می‌باشند). این نتاج برای تلاقی برگشتی دوم گزینش شدند. نتایج به خوبی نشان می‌دهد که الگوی توارث این ژن هم‌بارزی است. بنابراین در مرحله‌ی آخر پژوهش و پس از خودگشنی لاین‌های به‌دست آمده از نسل آخر تلاقی برگشتی، نتاج هموزیگوت حساس (طول باند ۸۳ جفت‌باز)، هتروزیگوت (طول باند ۸۵۸ و ۸۳ جفت‌باز) و هموزیگوت مقاوم (طول باند ۸۵۸ جفت‌باز) به خوبی قابل ژنوتیپ‌یابی خواهند بود.

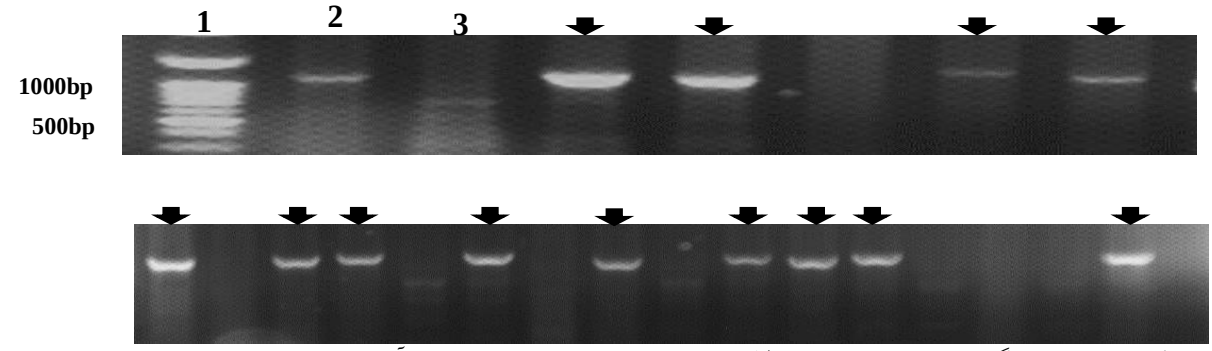


شکل ۱– (۱) نشانگر (۱۰۰ جفت‌باز)؛ (۲) لاین استاندارد *Yr*5/6*Avocet'S با آلل مقاومت ژن *Yr*5 (طول باند ۸۵۸ جفت‌باز)؛ (۳) یکی از ارقام دارای آلل حساسیت (طول باند ۸۳جفت‌باز). سایر چاهک‌ها نتاج حاصل از تلاقی برگشتی اول، نتاج گزینش شده برای ژن *Yr*5 (دارای دو باند مقاومت و حساسیت) با فلش نشان داده شده‌اند (برخی از نتاج آورده شده است).

Figure 1. (1) 100bp+marker (2) Standard line *Yr5/6**Avocet'S' with resistance allele of *Yr5* gene (fragment length of 858 bp) (3) One of the cultivars with susceptible allele (fragment length of 83bp). The other wells are the result of the first backcross. The progeny selected for the *Yr5* gene (with two fragment of resistance and susceptible) are shown with arrows (some of the progenies are shown).

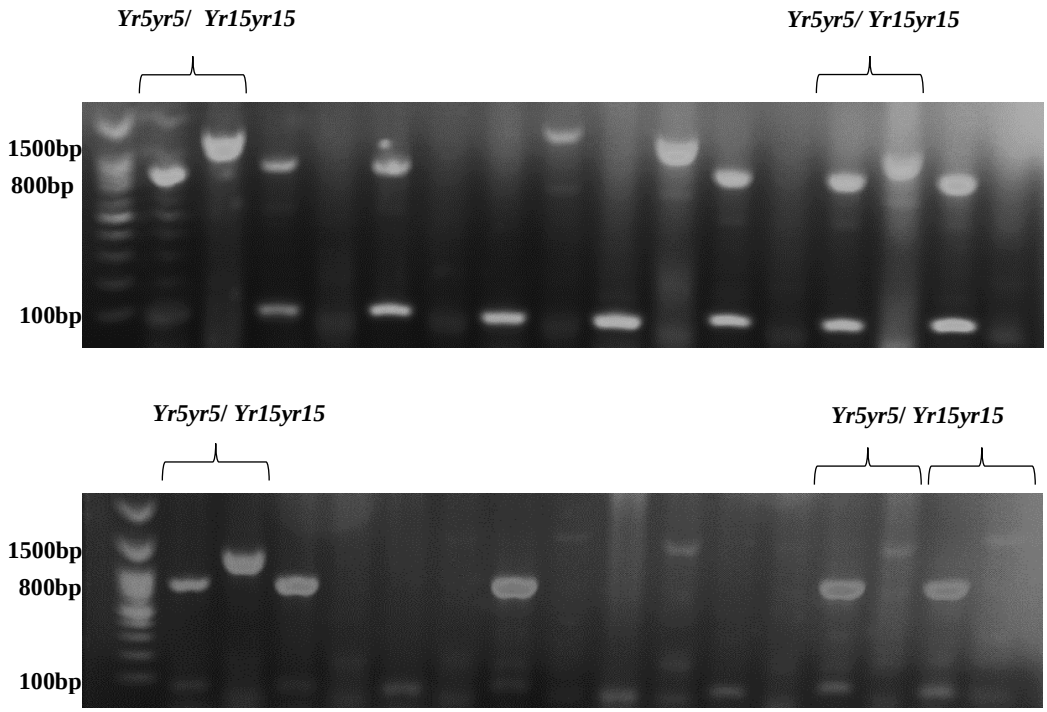
تلاقی برگشتی به کمک نشانگر ژن *Yr15*: نشانگرهای اختصاصی این ژن نیز در سال ۲۰۱۸ معرفی گردید که از ارقام وحشی خویشاوند گندم، به ارقام گندم نان منتقل شده است. در این ژن، آلل مقاوم دارای طول باند ۱۳۵۵ جفت‌باز و آلل حساس دارای طول باند ٤٤٧ جفت‌باز یا بدون باند است (Klymiuk *et al.*, 2018). ارقام حساس مورد مطالعه در این پژوهش بدون باند بودند. ژنوتیپ‌هایی که باند ۱۳۵۵ جفت‌باز را نشان دادند گزینش شدند (شکل۲). با توجه به این‌که در پژوهش حاضر بوته‌های حساس بر روی ژل باند نمی‌دهند و الگوی باندی نشانگر این ژن اختصاصی، غالبیت کامل است، در نسل‌های بعد برای تفکیک دو ژنوتیپ هموزیگوت مقاوم و هتروزیگوت، باید بذرهای هر بوته به‌صورت جداگانه روی یک خط کشت و هر بوته جداگانه ژنوتیپ‌یابی شود. به این ترتیب خطوط کامل با آلل مقاوم به عنوان ژنوتیپ‌های خالص گزینش خواهند شد.

گزینش برای دوژن *Yr15*+ *Yr5*: در بیماری زنگ زرد، تعداد زیادی ژن مقاومت نژاد اختصاصی شناسایی شده است. ولی طول عمر مقاومت حاصل از این ژن‌ها به‌دلیل تکامل سریع عامل بیماری‌زا، کوتاه است. بر اساس گزارش‌ها مقاومت حاصل از ترکیب دو ژن *Yr5* و *Yr15* شکسته نشده است (Marchal *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020)؛ از سوی دیگر وجود مقاومت تک‌ژنی مسئله ایجاد مقاومت پایدار را با مشکل مواجه می‌سازد (Omrani *et al.*, 2016). به عبارتی هرمی کردن ژن‌ها روش مؤثری برای ایجاد مقاومت پایدار به بیماری زنگ زرد است (Aktar-Uz- Zaman *et al.*, 2017; Zhang et *al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020). ژن‌های *Yr5* و *Yr15* به‌دلیل داشتن سازوکارهای ویژه و قابلیت اعطای مقاومت پایدار در کنار هم، در بین مهم‌ترین ژن‌های منتخب برای هرمی کردن ژن‌های مقاومت به زنگ زرد قرار دارند (Klymiuk *et al.*, 2018). این اهمیت در مطالعات دیگری نیز به اثبات رسیده است (Sivasamy *et al.*, 2017). در این پژوهش نیز به‌منظور ایجاد مقاومت پایدار، هرمی کردن این دو ژن در برخی ارقام از طریق تلاقی متقابل بین ژنوتیپ‌های هتروزیگوت گزینش شده در دو ژن صورت گرفت. به‌منظور ژنوتیپ‌یابی، نتاجی که درآلل‌های هر دو ژن هتروزیگوت بودند، گزینش شدند. به این ترتیب نتاجی که برای ژن *Yr*5 هر دو طول باند ۸۵۸ و ۸۳ جفت‌باز و برای ژن *Yr*15 طول باند ۱۳۵۵ و بدون باند را نشان دادند مورد گزینش قرار گرفتند (شکل ۳). نتایج تکرارپذیر بررسی‌های مولکولی، نشان‌دهنده انتقال موفق هر دو ژن به شش رقم ایرانی مورد بررسی در این پژوهش بود.



شکل ۲- (۱) نشانگر (۱۰۰ جفت‌باز)؛ (۲) لاین استاندارد ’*Yr*15/6*Avocet‘S’ با آلل مقاومت ژن *Yr15* (طول باند ۱۳۵۵ جفت‌باز)؛ (۳) یکی از ارقام دارای آلل حساسیت (بدون باند- عدم تشکیل باند ٤٤٧ جفت‌باز). سایر ستون‌ها نتاج حاصل از تلاقی برگشتی اول، نتاج گزینش شده برای ژن *Yr15* (دارای دو باند مقاومت و حساسیت) با فلش نشان داده شده‌اند (برخی از نتاج آورده شده است).

Figure 2. (1) 100bp+marker; (2) Standard line *Yr15/6**Avocet'S' with resistance allele of *Yr15* gene (fragment length of 1355 bp); (3) One of the cultivars with susceptability allele (no band of 447bp). The other wells are the result of the first backcross. The progeny selected for the *Yr15* gene (with two fragments of resistance and susceptability) are shown with arrows (some of the progenies are shown).



شکل ۳- تنوع ژنتیکی نتاج حاوی دو ژن *Yr*15 + *Yr*5 (برخی از نتاج آورده شده است). بریس‌ها، ژنوتیپ‌های گزینش شده (هتروزیگوت برای هر دو ژن) را نشان می‌دهند.

Figure 3. Genetic diversity of progeny containing two *Yr*5 + *Yr*15 genes (some offsprings are shown). Braces indicate selected genotypes (heterozygous for both genes).

شکسته شدن مقاومت ژن *Yr*5 و *Yr*15 در استرالیا و اروپا (Hovmoller *et al.*, 2007; Wellings, 2007)، احتمال شکسته شدن مقاومت در ایران را نیز بالا می‌برد، ولی هرمی کردن این دو ژن در یک رقم می‌تواند مقاومت مؤثر و پایداری را اعطا نماید (Fuchs, 2017; Zhang *et al.*, 2018). مطالعات همچنین نشان داده است تعداد ژن‌های هرمی شده نیز می‌تواند بر میزان مقاومت به زنگ نواری تأثیر بسیار معنی‌داری داشته باشد (Liu *et al.*, 2020). علاوه‌بر این تولید لاین‌های جدید دارای ژن‌های مقاومت به زنگ از طریق تلاقی برگشتی به کمک نشانگر راهی برای برای توسعه ارقام گندم دارای مقاومت بادوام، می‌باشد (Qie *et al.*, 2019).

انتقال ژن‌های مقاومت به زنگ زرد و هرمی کردن آن‌ها در این ارقام علاوه بر ممانعت از کاهش عملکرد در سال‌های اپیدمی این بیماری و ایجاد مقاومت پایدار، از لحاظ زیست محیطی نیز اثرات مطلوبی خواهد داشت.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) به‌خاطر حمایت مالی این تحقیق و از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر به‌خاطر در اختیار قرار دادن بذور والدهای *Yr*15/6*Avocet‘S’ و *Yr*5/6*Avocet‘S’ سپاسگزاری می‌نمایند.

References

Aghaei, H., Kasraei, P. and Nasri, M. (2017). The effect of lead and cadmium contamination on germination and grain characteristics of wheat cultivar Sivand. *Agricultural Sciences on the Edge of the Desert*, **14(1):** 23-35 (In Persian).

Aktar-Uz-Zaman, M., Tuhina-Khatun, M., Hanafi, M.M. and Sahebi M. (2017). Genetic analysis of rust resistance genes in global wheat cultivars: an overview. *Biotechnology & Biotechnological* Equipment, **31:** 431-445.

Barzegari, M., Emam Y. and Zamani, A. (2020). Yield components and grain yield responses of four wheat cultivars to growth retardant Cycocel under terminal drought stress conditions. *Journal of Crop Production and Processing*, **10(3):** 139-156 (In Persian).

Bonnett, D. G., Rebetzke, G. J. and Spielmeyer, W. (2005). Strategies for efficient implementation of molecular markers in wheat breeding. *Molecular Breeding*, **15:** 75-85.

Chen, X.M. (2005). Epidemiology and control of strip rust (*Puccinia striiformis f. sp. tritici*) on wheat. *Plant Pathology*, **27:** 314 -337.

Ebrahimi, M.N., Ahmadi, H., Darvishnia, M. and Goodarzi, D. (2024). Identification of bread wheat resistant genotypes to fusarium head blight disease and heritability estimation for some traits for bread wheat genotypes. *Plant Genetic Researches*, **10(2):** 137-152 (In Persian).

Eskandari Torbeghan, M., Fazli Kakhki, S.F. and Jalini, M. (2023). Compensate for reduced yield due to late water stress by using growth enhancers in the tillering stage of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Environmental Physiology*, **70(2):** 87-98 (In Persian).

Fuchs, M. (2017). Pyramiding resistance-conferring gene sequences in crops. *Current Opinion in Virology*, **26:** 36-42.

Hospital, F., Moreau, L., Lacoudre, F., Charcosset, A. and Gallais, A. (1997). More on the efficiency of marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics*, **95:** 1181-1189.

Hovmoller, M.S. and Justesen, A.F. (2007). Appearance of atypical *Puccinia striiformisf. sp. tritici* phenotypes in north-western Europe. *Australian Journal of Agricultural Research*,**58:** 518-524.

Huerta-Espino, J., Singh, R., Crespo-Herrera, L.A. Villaseñor-Mir, H.E., Rodriguez-Garcia, M.F., Dreisigacker, S., Barcenas-Santana, D. and 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

Gupta, P.K., Langridge, P. and Mir, R.R. (2010). Marker-assisted wheat breeding: present status and future possibilities. *Molecular Breeding*, **26:** 145-161.

Jalili, J., Palash, M. and Jalili, K. (2023). Evaluation of yield, yield components and water use efficiency of wheat cultivar Baharan under cultivation of different irrigation methods in Kermanshah province. *Scientific Progress and development of Kermanshah*, **2(3):** 79-97 (In Persian).

Joshi, R.K. and Nayak, S. (2010). Gene pyramiding-A broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crops. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **5(3):** 51-60.

Khanmakoo, F., Mohammadi, S.A., Salami, R. and Aharizad, S. (2019). Diversity of Resistance Gene Analogues in Rust Resistance and Susceptible Bread Wheat Varieties. *Plant Genetic Researches*, **5(2):** 29-40 (In Persian).

Klymiuk, V., Yaniv, E. and Huang, L. (2018). Cloning of the wheat *Yr15* resistance gene sheds light on the plant tandem kinase-pseudokinase family. *Nature Communication*, **9(1):** 3735.

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

Liu, R., Lu, J. and Zhou, M. (2020). Developing stripe rust resistant wheat (*Triticum aestivum L.*) lines with gene pyramiding strategy and marker-assisted selection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **67:** 381-391.

Liu, R., Lu, J., Zhou, M., Zheng, S., Liu, Z., Zhang, C. and Zhang, L. (2020). Developing stripe rust resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with gene pyramiding strategy and marker-assisted selection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **67:** 381-391.

Marchal, C., Zhang, J., Zhang, P., Fenwick, P., Steuernagel, B., Adamski, N.M., Boyd, L., McIntosh, R., Wulff, B.B.H., Berry, S., Lagudah, E. and Uauy, C. (2018). BED-domain-containing immune receptors confer diverse resistance spectra to yellow rust. *Nature Plants*, **4:** 662-668.

Najafiyan, G., Amin, H., Afshari, F. and Kabiriyan, H.R. (2010). Parsi, a new bread wheat cultivar, resistant to stem rust (Race Ug99) with good bread making quality for cultivation under irrigated conditions of temperate regions of Iran .*Seed and Plant Journal*, **26(2):** 289-292 (In Persian).

Omrani, A., Khodarahmi, M. and Afshari, F. (2016). The evaluation of stripe rust resistance sources in selected wheat genotypes to *Puccinia striiformis f. sp. tritici* Races. *mg.genetics*, **4:** 547-558 (In Persian).

Qie, Y., Liu, Y., Wang, M., Li, X., See, D. R., An, D. and Chen, X. (2019). Development, validation, and re-selection of wheat lines with pyramided genes Yr64 and Yr15 linked on the short arm of chromosome 1B for resistance to stripe rust. *Plant disease*, **103(1)**: 51-58.

Rezaie, A., Bijanzadeh, E., Behpouri, A., Barati, V. (2022). Investigation of weed control on assimilate remobilization, yield and yield components in mix cropping of wheat cultivars. *Journal of Plant Production Research*, **29(2)**: 1-18 (In Persian).

Rosewarne, G.M., Herrera-Foessel, S.A., Singh, R.P., HuertaEspino, J., Lan, C.X. and He, Z.H. (2013). Quantitative trait loci of stripe rust resistance in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **126:** 2427-2449.

Singh, R.P., Huerta Espino, J. and William, H.M. (2005). Genetics and breeding for durable resistance to leaf and stripe rusts in wheat. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, **29:** 121-127.

Sivasamy, M., Vikas, V.K., Jayaprakash, P., Kumar, J., Saharan, M. S. and Sharma, I. (2017). Gene pyramiding for developing high-yielding disease-resistant wheat varieties. In *Management of Wheat and Barley Diseases*, 361-409.

Sivasamy, M., Vikas, V.K., Jayaprakash, P., Kumar, J., Saharan, M.S. and Sharma, I. (2017). Gene Pyramiding for Developing High-Yielding Disease-Resistant Wheat Varieties. In: Singh, D.P. Ed., *Management of Wheat and Barley Diseases*. pp. 361-409. Apple Academic Press, Florida, USA.

Torabi, M., Madoukhi, V., Nazari, K., Afshari, F., Forootan, A.R., Ramai, M.A., Golzar, H. and Kashani, A.S. (1995). Effectiveness of wheat yellow rust resistance genes in different parts of Iran. *Cereal Rusts and Powdery Mildews Bulletin*, **23:** 9-12 (In Persian).

Wan, A.M., Chen, X.M. and He, Z.H. (2007). Wheat stripe rust in China. *Australian Journal of Agricultural Research*, **58(6):** 605-619.

Wang, F., Zhang, M., Hu, Y., Gan, M., Jiang, B., Hao, M. and Huang, L. (2023). Pyramiding of adult-plant resistance genes enhances all-stage resistance to wheat stripe rust. *Plant Disease*, **107(3):** 879-885.

Wellings, C.R., Boyd, L.A. and Chen, X.M. (2012). Resistance to Stripe Rust in Wheat: Pathogen Biology Driving Resistance Breeding. In: Sharma, I., Ed., *Disease Resistance in Wheat*, pp. 63-83. CABI, Wallingford, UK.

Wellings, C.R. (2007). Puccinia striiformis in Australia: a review of the incursion, evolution, and adaptation of stripe rust in the period 1979–2006. *Australian Journal of Agricultural Research*, **58:** 567-575.

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

Zhang, S., Wen, Z., Difonzo, C., Song, Q. and Wang, D. (2018). Pyramiding different aphid-resistance genes in elite soybean germplasm to combat dynamic aphid populations. *Molecular Breeding*, **38:** 1-12.

Ziyaev, Z.M., Sharma, R.C., Nazari, K., Morgounov, A.I., Amanov, A.A., Ziyadullaev, Z.F. and Alikulov, S.M. (2011). Improving wheat stripe rust resistance in Central Asia and the Caucasus. *Euphytica*, **179(1):** 197-207.