دانشکده‌ی کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته اصلاح نباتات

بررسی ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای (زنگ برگ) گندم با استفاده از نشانگرهای مولکولی

به کوشش

ملیحه کدخدایی

استاد راهنما

دکتر علی دادخدایی

شهریور ماه ۱۳۹۰

بسم الله الرحمن الرحيم

به نام خدا

اظهارنامه

اینجانب ملیحه کدخدایی (۸۷۰۵۶۳) دانشجوی رشته‌ی مهندسی کشاورزی گرایش اصلاح نباتات دانشکده‌ی کشاورزی اظهار می‌کنم که این پایان نامه حاصل پژوهش خودم بوده و در جاهایی که از منابع دیگران استفاده کرده‌ام، نشانی دقیق و مشخصات کامل آن را نوشته‌ام. همچنین اظهار می‌کنم که تحقیق و موضوع پایان نامه‌ام تکراری نیست و تعهد می‌نمایم که بدون مجوز دانشگاه دستاوردهای آن را منتشر ننموده و یا در اختیار غیر قرار ندهم. کلیه حقوق این اثر مطابق با آیین نامه مالکیت فکری و معنوی متعلق به دانشگاه شیراز است.

نام و نام خانوادگی: ملیحه کدخدایی

تاریخ و امضا: ۱۳۹۰/۶/۳۰

به نام خدا

بررسی ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای (زنگ برگ) گندم با استفاده از نشانگرهای مولکولی

به کوشش

ملیحه کدخدایی

پایان نامه
ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به عنوان بخشی از فعالیت‌های تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته‌ی

اصلاح نباتات

از دانشگاه شیراز

شیراز

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی شده توسط کمیته پایان نامه با درجه: عالی

دکتر علی دادخدایی، استادیار بخش زراعت و اصلاح‌نباتات (رئیس کمیته).....

دکتر بهرام حیدری، استادیار بخش زراعت و اصلاح‌نباتات .....

دکتر رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا، استادیار بخش گیاه‌پزشکی.....

شهریور ماه ۱۳۹۰

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

پدرم؛ تلاشگر همیشه پایدار زندگیم

که لبخند پر مهرش و نگاه پربار و دستان یاری دهنده اش همواره همراه من است.

مادرم؛ روشنایی بخش تمام سالهای زندگیم

مظهر مهر، صبر و فداکاری، که وجودش برایم همه عشق و امید است.

سپاسگزاری

اکنون که به یاری خداوند متعال این رساله به پایان رسیده است، بر خود لازم می‌دانم که از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر علی دادخدایی، که همواره مرا در اجرای این پژوهش راهنمایی نموده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را داشته باشم.

همچنین از جناب دکتر محمد تقی آساد برای کمک‌ها و حمایت‌های بی دریغشان کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از اساتید مشاور جناب آقای دکتر بهرام حیدری و جناب آقای دکتر رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا برای مشورت‌ها و راهنمایی‌های فراوانشان سپاسگزارم.

از کلیه کارکنان و اساتید بخش زراعت و اصلاح نباتات برای حمایتشان در انجام این پروژه کمال تشکر را دارم.

از مسئولان و اساتید پژوهشکده زیست فناوری به‌خصوص دکتر نیازی رئیس پژوهشکده و مهندس رمضانی و آرام که امکان انجام این تحقیق را برای من فراهم نمودند سپاسگزارم.

همچنین از دوستانم خانم‌ها پورخورشید، زمان ثانی، امامی، نیرومند، کشفی، نجابت، گلزاده و آقایان مقدم، سهرابی، مجرد، چهاردولی، هرتمنی کمال تشکر را دارم.

همچنین از تمامی دوستان و همکلاسی‌هایم در بخش زراعت و اصلاح نباتات و پژوهشکده زیست فناوری به خاطر کمک‌ها و دلگرمی‌های فراوانشان سپاسگزارم.

در انتها از خانواده عزیز و مهربانم برای کمک‌ها و دلگرمی‌های فراوانشان سپاسگزارم.

چکیده

بررسی ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای (زنگ برگ) گندم با استفاده از نشانگرهای مولکولی

به کوشش

ملیحه کدخدایی

زنگ قهوه‌ای یا زنگ برگ یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم است که تقریباً در تمام مناطق کشت این گیاه وجود داشته و باعث کاهش عملکرد محصول می‌گردد. به منظور تولید ارقام مقاوم باید ژن‌های مقاومت در منابع ژنتیکی شناسایی شده و از طریق ترکیب این ژن‌ها در یک پایه ژنتیکی مطلوب، مقاومت پایدار نسبت به عامل بیماری‌زا ایجاد گردد. در این پژوهش به منظور شناسایی حضور یا عدم حضور ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای *Lr9*، *Lr26*، *Lr28*، *Lr34* و *Lr35* با استفاده از نشانگرهای مولکولی STS و SCAR در ۸۴ ژنوتیپ مختلف گندم، ابتدا بذور تمام ژنوتیپ‌ها به همراه بذور مربوط به لاین آیزوژنیک هر ژن مقاومت به عنوان رقم کنترل مثبت و بذر رقم کنترل منفی Thatcher کشت گردید. DNA کلیه نمونه‌ها با استفاده از روش SDS استخراج گردید. براساس نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن‌های مقاومت *Lr9* و *Lr35* تنها در رقم کنترل مثبت وجود داشت و این ژن‌ها در رقم کنترل منفی و سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این پژوهش مشاهده نگردید. حضور ژن مقاومت *Lr26* علاوه بر لاین آیزوژنیک مربوط به این ژن مقاومت در ژنوتیپ‌های آرتا، پیشتاز، شیرودی و فلات شناسایی گردید. علاوه بر لاین آیزوژنیک مربوط به ژن مقاومت *Lr34*، حضور این ژن مقاومت در ژنوتیپ‌های اصلاح شده اکبری، بم، تجن، خزر ۱، سیستان و نیک نژاد شناسایی گردید. آغازگر Lr28-01/02 مربوط به ژن مقاومت *Lr28* موجب تکثیر نشانگر STS در تمام ژنوتیپ‌ها حتی آن‌هایی که فاقد ژن مورد نظر بودند گردید در نتیجه نیاز است یک آغازگر اختصاصی برای این ژن مقاومت طراحی گردد.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- گندم **۲**

۱-۲- اهمیت بیماری‌های گیاهی ۳

۱-۳- قارچ‌ها ۴

۱-۴- بیماری زنگ ۴

۱-۴-۱- زنگ قهوه‌ای گندم ۵

فصل دوم: مروری بر پژوهش‌های پیشین

۲-۱- استنتاج ژن ۹

۲-۲- نشانگرهای مولکولی ۹

۲-۲-۱- نشانگرهای مبتنی بر جایگاه‌های با توالی نشاندار (STS) ۱۲

۲-۲-۲- ناحیه تکثیر شونده با ردیف مشخص (SCAR) ۱۴

۲-۳- مقاومت ژنتیکی ۱۴

۲-۴- ارقام مقاوم ۱۶

۲-۵- لاین‌های تقریباً آیزوژنیک ۱۸

۲-۶- ژن مقاومت به زنگ برگ *Lr9* ۱۸

۲-۷- ژن مقاومت به زنگ برگ *Lr26* ۲۰

۲-۸- ژن مقاومت به زنگ برگ *Lr28* ۲۲

۲-۹- ژن مقاومت به زنگ برگ *Lr34* ۲۳

۲-۱۰- ژن مقاومت به زنگ برگ *Lr35* ۲۴

فصل سوم: مواد وروش‌ها

۳-۱- مواد گیاهی ۲۸

۳-۲- بررسی مولکولی ژن‌های مقاومت به زنگ برگ در ژنوتیپ‌های گندم ۳۰

۳-۲-۱- آغازگرهای مورد بررسی ۳۰

۳-۲-۲- استخراج DNA ۳۰

۳-۲-۳- حذف RNA ۳۳

۳-۲-۴- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و الکتروفورز ۳۴

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- نتایج حاصل از آغازگر STS (J13-1/2) ۳۸

۴-۲- نتایج حاصل از آغازگر SCAR (Iag95) ۴۱

۴-۳- نتایج حاصل از آغازگر STS (Lr28-01/02) ۴۶

۴-۴- نتایج حاصل از آغازگر STS (csLV34) ۴۸

۴-۵- نتایج حاصل از آغازگر SCAR (Sr39) ۵۳

۴-۶- نتیجه گیری ۵۵

۵- پیشنهادات ۵۷

۶- فهرست منابع ۵۸

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- چگونگی تشکیل آغازگر SCAR (Sr39) مربوط به ژن مقاومت به زنگ برگ *Lr35* **۲۶**

جدول ۳-۱- لاین‌های آیزوژنیک مورد استفاده در این پژوهش **۲۸**

جدول ۳-۲- ژنوتیپ‌های مورد استفاده برای بررسی مقاومت به بیماری زنگ قهوه‌ای گندم ۲۹

جدول ۳-۳- توالی آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش ۳۱

جدول ۳-۴- مواد و مقادیر مورد نیاز برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر بافر استخراج ۳۳

جدول ۳-۵- مواد و حجم‌های مورد نیاز برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۳۴

جدول ۳-۶- مواد و مقادیر مورد استفاده برای بافر تانک الکتروفورز ۳۵

جدول ۳-۷- سیکل گرمایی استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۳۶

جدول ۴-۱- نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۴۲

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۴-۱- الگوی باندی نشانگر STS (J13) اختصاصی برای ژن مقاومت به زنگ برگ *Lr9* در گندم ۳۹
شکل ۴-۲- الگوی باندی نشانگر SCAR (Iag95) اختصاصی برای ژن مقاومت به زنگ برگ *Lr26* در گندم ۴۴
شکل ۴-۳- الگوی باندی نشانگر STS (Lr28) اختصاصی برای ژن مقاومت به زنگ برگ *Lr28* در گندم ۴۷
شکل ۴-۴- الگوی باندی نشانگر STS (csLV34) اختصاصی برای ژن مقاومت به زنگ برگ *Lr34* در گندم ۴۹
شکل ۴-۵- شجره و گروه بندی آلل csLV34 مربوط به جفت ژن *Lr34/Yr18* در ارقام مورد استفاده در برنامه‌های مختلف اصلاحی گندم ۵۲
شکل ۴-۶- الگوی باندی نشانگر SCAR (Sr39) اختصاصی برای ژن مقاومت به زنگ برگ *Lr35* در گندم ۵۴

فصل اول

مقدمه

با افزایش جمعیت، مشکل تأمین مواد غذایی را تنها می‌توان با افزایش عملکرد در واحد سطح بهبود بخشید. این کار مستلزم اصلاح گیاهان و افزایش پتانسیل ژنتیکی آن‌هاست. رسیدن به توان بالای تولید و نیز ثبات تولید، از طریق بهبود اجزای عملکرد و مقابله با عوامل نقصان دهنده عملکرد امکان‌پذیر است (خدابنده، ۱۳۷۲).

یکی از عواملی که باعث کاهش عملکرد گیاهان زراعی شده، وجود تنش در طول فصل رشد آن می‌باشد. تنش‌های محیطی به دو گروه تنش‌های زیستی[1] و تنش‌های غیرزیستی[2] تقسیم می‌گردند. تنش‌های غیرزیستی شامل خشکی، شوری، سرما و تنش‌های زیستی مشتمل بر آفات، علف‌های هرز، بیماری‌های باکتریایی، قارچی، نماتدی و ویروسی می‌باشند. بیماری‌های گیاهی نقش عمده‌ای در کاهش میزان محصول دارند (Wiese, 1987) و ۱۳ درصد از کل تولیدات زراعی جهان به وسیله آن‌ها از بین می‌رود (Montesinos *et al.*, 2002).

۱-۱- گندم

غلات مهم‌ترین گیاهان غذایی کره زمین و تأمین کننده ۷۰ درصد غذای مردم کره زمین می‌باشند. گندم و برنج تقریباً ۶۰ درصد انرژی مورد نیاز بشر را تأمین می‌کنند و به طور کلی بیش از سه چهارم انرژی و یک سوم پروتئین مورد نیاز بشر از غلات تأمین می‌شود و براستی غلات پایه اصلی تغذیه و بقای بشر به شمار می‌روند (امام، ۱۳۸۲). در دنیای امروز گندم یک ماده غذایی اساسی و مهم است (رجبی و بهروزین، ۱۳۸۲) و یکی از مهم‌ترین منابع پروتئین و کالری محسوب می‌گردد که در شرایط متفاوت از نظر دما و رطوبت قابل کشت می‌باشد

[1]. Biotic stress
[2]. Abiotic stress

(خدابنده، ۱۳۷۲). این گیاه طی قرون گذشته و در حال حاضر مهم‌ترین گیاه زراعی بشر بوده و از نظر سطح زیر کشت و میزان تولید مقام اول را داراست (کافی و همکاران، ۱۳۸۳).

یکی از اهداف مهم اصلاحی در گندم ایجاد ارقام مقاوم به بیماری‌هایی است که عملکرد دانه و کیفیت آن را کاهش می‌دهند (پولمن و اسلیپر، ۱۳۸۳). با شروع کشاورزی و کشت جمعیت-های یکنواخت گیاهی در یک مکان، به‌خصوص کشت مداوم آن‌ها در همان مکان، شرایط مساعد جهت استقرار و توسعه بیماری‌های گیاهی فراهم می‌گردد. انتخاب ارقام گیاهی با عملکرد بالا و اغلب حساس به عوامل بیماری‌زا و مکانیزه کردن روش‌های تولید، موجب افزایش مشکلات ناشی از بیماری‌های گیاهی گردیده است به‌طوری که حتی انتخاب روش‌های جدید و پر هزینه مبارزه با بیماری‌های گیاهی نیز نتوانسته است از وقوع آن جلوگیری کند (Agrios, 2004).

۱-۲- اهمیت بیماری‌های گیاهی

حیات بشر وابسته به گیاهان بوده و ۹۰ درصد مواد غذایی مورد نیاز بشر از این طریق تأمین می‌گردد. از حدود ۳۰۰۰ نوع گیاهی که برای انسان ارزش غذایی دارد، ۳۰۰ نوع به طور وسیع کشت می‌شود و ده نوع که مهم‌ترین آنها گندم و برنج هستند، ۸۵ درصد غذای بشر را تأمین می‌کنند. با توجه به اهمیت گیاهان و نقش مهمی که در تأمین مواد غذایی انسان دارند، انجام اقدامات لازم به منظور افزایش تولید و حفظ و حراست آن‌ها از حمله آفات و بیماری‌ها اهمیت فوق‌العاده دارد (بهداد، ۱۳۸۵).

با توجه به این که گیاهان مورد حمله بیماری‌های زیادی قرار می‌گیرند و به طور متوسط هر گیاهی می‌تواند مورد حمله ۱۰۰ نوع بیماری قرار گیرد، اهمیت بیماری‌های گیاهی برای ما بیشتر نمایان می‌گردد (بهداد، ۱۳۸۵).

عوامل بیماری‌زا میکروارگانیسم‌هایی هستند که با ایجاد تغییر در آناتومی، مورفولوژی و یا متابولیسم گیاه باعث کاهش کمیت و کیفیت محصول می‌گردند. به منظور ایجاد بیماری در گیاه می‌بایست گیاه و عامل بیماری‌زا موجود بوده و شرایط محیطی مناسبی نیز وجود داشته

باشد. گیاه و عامل بیماری‌زا تحت تأثیر شرایط مناسب محیطی قرار گرفته و بر یکدیگر اثر متقابل می‌گذارند. گاهی شرایط محیطی بیماری را تشدید و زمانی از توسعه آن جلوگیری می‌کند. گیاه نیز شرایط آب و هوایی محیط پیرامون خود را تغییر می‌دهد و به این طریق بر رشد خود و عامل بیماری‌زا اثر می‌گذارد. از طرف دیگر عامل بیماری‌زا نیز بر رشد و حساسیت گیاه نسبت به شرایط نامساعد محیطی و یا سایر عوامل بیماری‌زا اثر می‌گذارد (خواجه پور، ۱۳۸۴). از جمله عوامل بیماری‌زایی که منجر به ایجاد بیماری در گیاه می‌گردد، قارچ‌ها می‌باشند.

۱-۳- قارچ‌ها[1]

قارچ‌ها از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در گیاهان محسوب می‌گردند که می‌توانند به تمامی اندام‌های گیاهان حمله کنند (سینگ، ۱۳۸۱). این بیمارگرها به دلیل این که فاقد کلروفیل بوده، مواد غذایی مورد نیاز خود را به صورت انگل اجباری از گیاهان زنده و یا به طور انگل از مواد مرده تأمین می‌کند. تاکنون حدود صد هزار گونه قارچ در دنیا شناسایی شده است که نزدیک به ۸۰۰۰ گونه از آن‌ها در گیاهان عامل بیماری می‌باشند (بهداد، ۱۳۸۵). از جمله بیماری‌هایی که توسط این عوامل بیماری‌زا ایجاد می‌گردد بیماری زنگ می‌باشد.

۱-۴- بیماری زنگ

زنگ‌های گیاهی در اثر قارچ‌های راسته Uredinales، رده بازیدیومیست‌ها ایجاد می‌شود و از زیان‌آورترین بیماری‌های گیاهی محسوب می‌گردند. بیشترین اثر تخریبی این بیماری‌ها بر غلات به‌خصوص گندم می‌باشد. قارچ‌های مولد زنگ بیشتر به برگ و ساقه حمله می‌کنند. عفونت‌های ناشی از زنگ معمولاً به صورت لکه‌های متعدد به رنگ زنگ آهن، نارنجی، زرد یا حتی سفید بروز می‌کنند و در برخی از آن‌ها برجستگی و حتی گال ایجاد می‌شود. بیشتر

[1]. Fungi

عفونت‌های زنگ گیاهی به صورت لکه‌های موضعی بوده ولی در برخی موارد ممکن است سیستمیک هم باشند (اگریوس، ۱۳۸۹).

زنگ‌ها ممکن است گیاهان جوان را ناتوان ساخته، اما در اکثر موارد با کاستن از میزان فتوسنتز، افزایش میزان تنفس و کاهش انتقال مواد ساخته شده از بافت‌های آلوده و بالعکس انتقال این مواد به بافت‌های عفونی، منجر به کاهش برگساره، ریشه و همچنین عملکرد می‌گردند. کمیت و کیفیت محصول به دست آمده از گیاه آلوده به زنگ نیز به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته، چنان که گاهی ممکن است دانه فاقد نشاسته و بیشتر محتوی مواد سلولزی باشد که فاقد ارزش غذایی یا ارزش غذایی کم برای انسان است (اگریوس، ۱۳۸۹).

سه نوع بیماری زنگ توسط این جنس عامل در گندمیان زراعی و وحشی ایجاد می‌گردد که شامل زنگ نواری[1] (زنگ زرد)، زنگ برگ[2] (زنگ قهوه‌ای) و زنگ ساقه[3] (زنگ سیاه) می‌باشد.

۱-۴-۱- زنگ قهوه‌ای گندم

زنگ قهوه‌ای که توسط *Puccinia triticina* (*P. recondita* f. sp. *tritici* Rob. ex Desm.) ایجاد می‌گردد، به لحاظ وسعت پراکندگی و میزان خسارت در مناطق مختلف جهان، به عنوان مهم‌ترین بیماری گندم شناسایی شده (ترابی و همکاران، ۱۳۸۰)، و در عرصه جهانی نسبت به زنگ زرد و سیاه گستردگی بیشتری دارد (Chester, 1946). این بیماری از جمله بیماری‌های مخرب در برخی از مناطق جهان از جمله امریکا می‌باشد (Roelfs *et al*., 1992; McIntosh *et al*., 1995) و در کشورهایی مانند سوئیس، مجارستان، آلمان، رومانی، مناطقی از فرانسه، ایتالیا و لهستان به صورت همه‌گیر ظاهر شده است (Winzeler *et al*., 2000). این بیماری نخستین بار در سال ۱۳۲۵ از ایران گزارش گردید (اسفندیاری، ۱۳۲۶) و در مناطق گرم و مرطوب مانند دشت مغان، شمال خوزستان خسارت چشمگیری ایجاد می‌کند. این بیماری در تمام مناطق کشور گزارش شده است و اهمیت اقتصادی آن مشابه یا بیشتر از زنگ سیاه و کمتر از زنگ زرد می‌باشد (بهداد، ۱۳۸۵).

---

[1] . Stripe rust or Yellow rust
[2] . Leaf rust or Brown rust
[3] . Stem rust or Black rust

این بیماری به جز سال‌هایی که به صورت همه‌گیر ظاهر شده و باعث کاهش ۹۰ درصدی محصول می‌شود، همه ساله با شیوع در اواخر فصل رویش گندم باعث کاهش نسبی محصول، چروکیدگی و نامرغوب شدن بذرها می‌گردد (بهداد، ۱۳۶۲) و با توجه به مرحله رشد گیاه، شرایط فصل زراعی، زمان وقوع همه‌گیری موجب کاهش عملکرد به میزان ۵ تا ۱۵ درصد می‌گردد (Messmer *et al*., 2000).

علائم بیماری به صورت جوش‌های بیضی شکل پراکنده، به رنگ نارنجی مایل به قهوه‌ای در سطح برگ و روی غلاف ظاهر می‌گردد. قارچ عامل بیماری به ندرت غلاف برگ، ساقه و خوشه را آلوده می‌کند. دانه‌های گندم بوته‌های مبتلا به بیماری چروکیده، کوچک، نامرغوب شده، در صورت وقوع همه‌گیری موجب کاهش وزن محصول تا ۹۰ درصد می‌گردد (رجبی و بهروزین، ۱۳۸۲).

ظهور بیماری در هر منطقه، به میزان مایه بیماری‌زای اولیه و شرایط آب و هوایی بستگی دارد. در سال‌هایی که جمعیت عامل بیماری پایین باشد در صورت فراهم شدن شرایط محیطی، بیماری با چند چرخه به شکل یوریدینیوسپور روی برگ‌های گندم و یا علف‌های هرز میزبان ظاهر می‌گردد. در سال‌هایی که مایه بیماری‌زای کافی موجود باشد و شرایط محیطی نیز مساعد باشد، بیماری به صورت همه‌گیر روی میزبان حساس ظاهر می‌گردد (افشاری و همکاران، ۱۳۸۴). عامل بیماری علاوه بر گندم به جو، چاودار و بعضی از گرامینه‌های وحشی نیز حمله می‌کند (بهداد، ۱۳۸۵).

با توجه به اهمیت بیماری زنگ قهوه‌ای و تأثیر آن در کاهش عملکرد و کیفیت گندم تاکنون کارهای مولکولی کمتری در سطح کشور بر روی آن انجام گرفته است. لذا این پژوهش به منظور شناسایی ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای (زنگ برگ) در ارقام مختلف گندم با زمینه‌های ژنتیکی متنوع با استفاده از نشانگرهای مولکولی طرح‌ریزی گردید.

فصل دوم

مروری بر پژوهش‌های پیشین

ضعف عملکرد گیاه ممکن است ناشی از عوامل مختلفی چون شرایط نامطلوب محیطی، کمبود مواد غذایی و یا آفات و بیماری‌ها باشد که تشخیص عوامل ایجاد کننده آن‌ها به روش شناسایی قابل اعتماد عوامل اختصاصی آلوده کننده بستگی دارد. عوامل بیماری‌زا ممکن است ویروس، باکتری، قارچ، نماتد یا ترکیبی از این‌ها باشد. علائم این بیماری‌ها و عوامل محیطی ممکن است همیشه به راحتی قابل تشخیص نباشند. روش‌های مولکولی راه‌حل‌های جامعی را برای تشخیص این احتمالات و شناسایی ژنوتیپ یا گونه اختصاصی عوامل بیماری‌زا ایجاد کرده است (هِنری، ۱۳۸۱).

طی دهه ۱۹۸۰ میلادی، رویدادی مهم در شرکت ستوس[1] امریکا به وقوع پیوست و محققین این مرکز را قادر ساخت یک روش خارج‌سلولی[2] به نام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[3] (PCR) برای تکثیر قطعات DNA ابداع نمایند. این تکنیک مبتنی بر فرآیند همانندسازی نیمه حفاظتی DNA بوده و به وسیله آنزیم‌های DNA پلیمراز در سلول‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی انجام می‌پذیرد (چاولا، ۱۳۸۷). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز امکان تکثیر توالی خاصی از DNA را میسر ساخته و فرآورده‌های حاصل از آن برای شناسایی ژنوتیپ موجود مناسب می‌باشد و مزیت این واکنش حساسیت و اختصاصی بودن آن می‌باشد (هنری، ۱۳۸۱). به منظور تکثیر قطعه هدف کافی است توالی دو انتهای قطعه DNA مورد نظر یا آغازگر موجود باشد، به‌طوری که دو الیگونوکلئوتید بتوانند با توالی هدف اتصال برقرار کرده و تکثیر آن قطعه را مقدور سازند (چاولا، ۱۳۸۷).

از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به میزان زیادی در تشخیص عوامل بیماری‌زای گیاهی استفاده گردیده است (Henson and French, 1993). از جمله این عوامل که به‌واسطه PCR تشخیص داده شده‌اند سویه‌های tritici و avena از *Gaeumannomyces graminis*

---

[1] . Cetus
[2] . *In vitro*
[3] . Polymerase Chain Reaction

هستند که به ترتیب عوامل بیماری پاخوره در گندم و یولاف را ایجاد می‌کنند (Ward, 1995).

۲-۱- استنتاج ژن[1]

پیش از کشف و شناسایی نشانگرهای مولکولی، به منظور شناسایی ژن‌های مقاومت از آزمایش استنتاج ژن استفاده می‌گردید. بدین ترتیب که گیاهچه مربوط به ژرم‌پلاسم‌های مختلف را با تیپ‌های پرآزار و ناپرآزار[2] قارچ تلقیح کرده، از طریق مقایسه واکنش ژنوتیپ‌ها و ارقام استاندارد به گروهی از نژادهای زنگ، ژن‌های مقاومت شناسایی می‌شدند. این روش دارای محدودیت‌هایی می‌باشد از جمله این که ژن‌های مؤثر در مرحله گیاه کامل مانند ژن *Lr35* در مرحله گیاهچه-ای قابل شناسایی نیستند و وجود و عدم وجود بیماری‌زایی برای آن‌ها در شرایط گلخانه به سادگی قابل تشخیص نمی‌باشد. همچنین شناسایی همه ژن‌ها با استفاده از نژادهای فیزیولوژیک موجود امکان‌پذیر نمی‌باشد و علاوه بر این، در صورت وجود دو ژن مقاومت به زنگ در گیاه، اگر ژن اول تیپ آلودگی[3] پایین‌تر نسبت به ژن دوم ایجاد کند، ژن دوم دیگر به وسیله این روش قابل شناسایی نیست و تنها از طریق شناسایی ژن دیگری که با این ژن در گیاه پیوستگی داشته باشد قابل تشخیص می‌باشد (Singh, 1993).

۲-۲- نشانگرهای مولکولی

با وجود پیشرفت‌هایی که در زمینه اصلاح برای مقاومت به بیماری‌ها صورت گرفته است، به دلیل ایجاد نژادهای جدید بیمارگر و کشت گسترده ارقام مقاوم، مقاومت ارقام شکسته می‌شود. به منظور غلبه بر این مشکلات استفاده از ژرم‌پلاسم‌هایی که حامل ترکیبی از ژن‌های مقاومت مؤثر هستند، نوید بخش خواهد بود، به‌خصوص ژن‌هایی که در خویشاوندان وحشی یا گونه‌های

[1]. Gene postulation
[2]. Virulence and avirulence types
[3]. Infection type