

## تنوع آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری در ارقام مقاوم و حساس به زنگ گندم نان

فرانک خان‌ماکو<sup>۱</sup>، سید ابوالقاسم محمدی<sup>۲\*</sup>، رباب سلامی<sup>۱</sup> و سعید اهری‌زاد<sup>۲</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

۲- استاد، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۱)

### چکیده

بیماری‌های قارچی به خصوص زنگ‌های زرد و قهوه‌ای باعث کاهش عملکرد گندم در ایران و جهان می‌شوند. در این مطالعه، تنوع ژنتیکی ۲۰ رقم گندم نان با پاسخ متفاوت به زنگ‌های قهوه‌ای و زرد با استفاده از آغازگرهای طراحی شده براساس نواحی حفاظت شده ژن‌های مقاومت به بیماری بررسی شد. الگوی نواری نشانگرهای چند شکل به صورت غالب امتیازدهی و تعداد نوار تکثیر شده و درصد چند شکلی تعیین گردید. علاوه بر این، برای هر ترکیب آغازگری، پارامترهای محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) محاسبه شد. از مجموع ۱۱ آغازگر منفرد و جفت، پنج ترکیب آغازگری به همراه یک آغازگر منفرد تکثیر مناسب و قابل امتیازدهی تولید کردند. حداکثر و حداقل میانگین PIC به ترتیب مربوط به آغازگر LLOOP-1 و جفت آغازگر H2016-H2020 با میزان ۰/۵۰ و ۰/۲۸ بود. جفت آغازگرهای H2016-H1146 و H2016-H2020 با میانگین ۴/۸۰ و ۲/۸۴ به ترتیب حداکثر و حداقل MI را داشتند. تجزیه خوشه‌ای براساس الگوریتم Neighbor-Joining و ضریب فاصله تکاملی P-distance، ارقام مورد مطالعه را به چهار گروه متناسب کرد و این گروه‌بندی با پاسخ به زنگ زرد ارقام مطابقت داشت. در تجزیه به بردارهای اصلی، پراکنش ارقام براساس دو بردار اصلی اول، چهار گروه حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تأیید کرد.

**واژگان کلیدی:** آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت، تنوع ژنتیکی، زنگ زرد، زنگ قهوه‌ای

\* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: mohammadi@tabrizu.ac.ir

## مقدمه

گیاهان زراعی و کاهش خسارت ناشی از آن‌هاست. لازمه تولید چنین ارقامی شناسایی، جداسازی و مکان‌یابی ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها جهت استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی می‌باشد.

گام اول در تولید ژنوتیپ‌های مقاوم به بیماری‌ها، تعیین تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم‌های گیاهی از نظر ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها می‌باشد. ژنوم بزرگ گندم که حدود ۸۵ درصد آن را توالی‌های تکراری تشکیل می‌دهد، شناسایی و همسانه‌سازی ژن‌ها را با مشکل مواجه می‌سازد (Gill et al., 2004)، اکثر ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها به شکل خانواده‌های ژنی دسته‌بندی شده در ناحیه خاصی از کروموزوم‌ها واقع شده‌اند (Wise, 2000). علاوه بر این، تعداد زیادی از توالی‌های شبیه به ژن‌های مقاومت در ژنوم گیاهان وجود دارد که این توالی‌ها آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری<sup>۱</sup> (RGA) یا هومولوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری<sup>۲</sup> (RGH) نامیده می‌شوند (Soriano et al., 2005). تاکنون پنج گروه از ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها در گیاهان شناسایی شده‌اند که بزرگترین گروه، ژن‌های رمز کننده پروتئین‌هایی با جایگاه حفاظت شده-NBS-LRR<sup>۳</sup> می‌باشند (Jiang et al., 2007; Ma, 2015). با وجود این منبع بزرگ از ژن‌های مقاومت، تعداد نسبتاً کمی از آن‌ها همسانه شده و به طور کامل مورد شناسایی قرار گرفته‌اند (Liu et al., 2007)، در حالی که در مقایسه با ژن‌های مقاومت، هزاران آنالوگ آن‌ها در ژنوم بسیاری از گیاهان شناسایی شده‌اند. RGA‌های گیاهان، گروه بزرگی از ژن‌های بالقوه مقاومت هستند که دارای دامنه و ویژگی‌های ساختاری محافظت شده می‌باشند که نقش ویژه‌ای در تعاملات میزبان و پاتوژن دارند (Sekhwal et al., 2015). RGA‌ها به عنوان نماینده ژن‌های مقاومت، منابع ژنتیکی در دسترس برای توسعه نقشه‌های ژنتیکی ژن‌های مقاومت، طراحی نشانگرهای دژنره، نشانگرهای دارای پیوستگی با ژن‌های مقاومت و مکان‌یابی QTL هستند. نشانگرهای طراحی شده از RGA‌ها می‌توانند

گندم نان یکی از مهمترین گیاهان زراعی و با ارزش‌ترین غله دنیا به شمار می‌رود که به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد از جمله سازگاری با شرایط مختلف آب و هوایی و خاصیت نانوائی مطلوب به طور وسیعی در الگوی غذایی حدود ۷۵ درصد جمعیت جهان قرار دارد (Shewry, 2009; Maestra and Naranjo, 2000). طبق گزارش سازمان خواروبار جهانی (FAO, 2017) در سال ۲۰۱۶ میزان تولید گندم در دنیا، ۷۲۹ میلیون تن و در ایران ۱۰ میلیون و ۶۰۰ هزار تن بوده است.

تولید گندم نیز مانند سایر محصولات کشاورزی تحت تأثیر انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌باشد که چالش‌های مهمی را برای امنیت غذایی طیف گسترده‌ای از مردم جهان ایجاد می‌کند. بروز انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی یکی از عوامل مهم کاهش تولیدات کشاورزی در سطح جهان به شمار می‌رود. به عنوان مثال، عوامل بیماری‌زا به تنهایی موجب کاهش ۱۲ درصدی تولید گیاهان زراعی در جهان می‌باشند (Rommens and Kishore, 2000). میزان کاهش محصول گندم در اثر تنش‌های زیستی و غیرزیستی نیز در تحقیقات مختلف به طور متوسط سالانه ۲۵ درصد عنوان شده است (Reynolds et al., 2012). بنابراین، می‌توان عنوان کرد که کاهش میزان خسارت عوامل بیماری‌زا می‌تواند یکی از چالش‌های مهم در برنامه‌های اصلاحی گندم در دنیا باشد. زنگ قهوه‌ای یا زنگ برگ با عامل قارچی *Puccinia recondia f. sp. tritici* بیشترین پراکنش را در سطح جهان داشته و تولید گندم را تحت تأثیر قرار می‌دهد. زنگ زرد با عامل قارچی *Puccinia striiformis sp. tritici* نیز یکی دیگر از مهمترین و پر خسارت‌ترین بیماری‌های گندم در بسیاری از نقاط جهان است که در صورت وجود شرایط محیطی مناسب و میزبان حساس، گاهاً خسارت این بیماری بیش از ۷۰ درصد نیز گزارش است (McIntosh et al., 1995; Chen, 2005; Cloutier et al., 2007). تولید و استفاده از ارقام مقاوم یکی از راهکارهای اصلی و عملی برای کنترل بیماری‌ها در

1- Resistant gene analog

2- Resistant gene homolog

3- Nucleotide binding sites-leucine rich repeats

**مواد گیاهی:** مواد گیاهی مورد مطالعه شامل ۲۰ رقم گندم نان با پاسخ متفاوت به زنگ‌های زرد و قهوه‌ای بود که از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد (جدول ۱).

**استخراج DNA ژنومی و تکثیر آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها:** برای استخراج DNA ژنومی، ۲۰ بذر از هر رقم در گلخانه کشت و نمونه‌های برگ‌ی در مرحله ۶-۷ برگ‌ی برداشت و استخراج DNA به روش CTAB انجام شد (Saghai-Marouf *et al.*, 1984). کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی گردید. در نهایت نمونه‌های DNA استخراجی برای انجام مراحل بعدی به ۲۵ نانوگرم بر میکرولیتر رقیق شدند.

برای تکثیر RGAها در گندم از ۱۱ ترکیب آغازگری استفاده شد که شش ترکیب آغازگری قطعاتی را در ارقام گندم مورد مطالعه تکثیر کردند. ترکیبات آغازگری استفاده شده در جدول ۲ و مشخصات آغازگرها در جدول ۳ آورده شده است. با توجه به اینکه آغازگرهای RGA براساس قسمت‌های حفاظت شده خانواده ژن‌های مقاومت به بیماری مانند خانواده‌های NBS-LRR یا Kinase طراحی شده‌اند؛ بنابراین می‌توانند به صورت منفرد برای تکثیر اعضای یک خانواده و یا جفتی برای تکثیر اعضای دو خانواده ژنی استفاده شوند.

چرخه‌های دمایی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه با واسرشته‌سازی در دمای ۹۴°C به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۴۸-۴۶°C (بسته به آغازگر) به مدت یک دقیقه و بسط در دمای ۷۲°C به مدت دو دقیقه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت هفت دقیقه بود. برای تعیین دمای مناسب جهت اتصال آغازگرها از گرادیان دمایی استفاده شد. محصولات تکثیری با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد تفکیک گردید.

برای نقشه‌یابی و همسانه‌سازی ژن‌های مقاومت در اهداف اصلاحی استفاده شوند (Leister *et al.*, 1996; Ameline-Torregrosa *et al.*, 2008; Arya *et al.*, 2014; Sekhwal *et al.*, 2015; Kassa *et al.*, 2017).

آغازگرهای دژنره، آغازگرهای طراحی شده براساس توالی حفاظت شده ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها هستند که در گندم و گیاهان دیگر برای بررسی تنوع ارقام از نظر آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری استفاده شده‌اند (Mantovani *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). به عنوان مثال، در آراییدوبسیس ۱۶۶ ژن با دامنه NBS-LRR شناسایی شده است (Richly *et al.*, 2002). NBS-LRRهای حاوی RGAها در گیاهان متعددی مانند گندم (*Bouktila et al.*, 2014)، *Aegilops tauschii* (Jia *et al.*, 2015)، *Triticum urartu* (Ling *et al.*, 2013; Gu *et al.*, 2015)، جو (Gu *et al.*, 2015)، ذرت (Wei *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014)، پنبه (Cheng *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015)، برنج (Fritz-Laylin *et al.*, 2015; O'Toole *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2015) و سورگوم (Cheng *et al.*, 2010; Mace *et al.*, 2014) بررسی شده‌اند. مانوانی و همکاران (Mantovani *et al.*, 2006) تنوع نواحی کروموزومی حامل ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها را در ۵۸ ژنوتیپ گندم دوروم با استفاده از آغازگرهای دژنره و روش NBS-profiling (این روش موتیف‌های محافظت شده در دومین‌های عملکردی خانواده ژنی را مشخص می‌کند، بنابراین بررسی تنوع ژنتیکی، در داخل یا اطراف ژن‌های عملکردی انجام می‌شود) بررسی و کارآیی این نشانگرها را معادل SSR و AFLP گزارش کردند.

هدف این مطالعه، بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مقاوم و حساس به زنگ‌های زرد و قهوه‌ای و تعیین الگوی نواری احتمالی متمایز کننده ارقام گندم با پاسخ متفاوت به زنگ-ها با استفاده از آغازگرهای دژنره طراحی شده براساس نواحی حفاظت شده دامنه ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها بود.

**مواد و روش‌ها**

جدول ۱- مشخصات ارقام گندم نان مورد مطالعه (تیپ رشد و پاسخ به زنگ‌های زرد و قهوه‌ای).

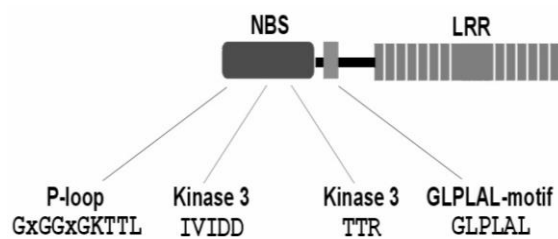
Table 1. Characteristics of the studied bread wheat varieties (growth type, response to yellow and leaf rusts).

پاسخ به زنگ Response to rust		تیپ رشد Growth type	رقم Variety
زنگ قهوه‌ای Leaf rust	زنگ زرد Yellow rust		
نیمه مقاوم Semi Resistance	نیمه حساس Semi susceptible	بهاره Spring	زاگرس Zagros
نیمه مقاوم Semi Resistance	مقاوم Resistance	پاییزه Winter	Mv17
مقاوم Resistance	مقاوم Resistance	بهاره Spring	نیک‌نژاد NikNejad
نیمه مقاوم Semi resistance	حساس Susceptible	بهاره Spring	فلات Falat
نیمه مقاوم Semi resistance	مقاوم Resistance	بهاره Spring	مروراید Morvarid
نیمه مقاوم Semi resistance	حساس Susceptible	بهاره Spring	اترک Atrak
نیمه مقاوم Semi resistance	حساس Susceptible	بهاره Spring	اینیا Inia
نیمه حساس Susceptible	حساس Susceptible	بهاره Spring	گلستان Gholesthan
نیمه مقاوم Semi resistance	نیمه حساس Semi susceptible	بهاره Spring	مهدوی Mahdavi
نیمه مقاوم Semi resistance	حساس Susceptible	بهاره Spring	تجن Tajan
حساس Susceptible	حساس Susceptible	بهاره Spring	بولانی Bolani
حساس Sensitive	حساس Susceptible	بینابین Facultative	شهریار Shahryar
حساس Susceptible	حساس Susceptible	بهاره Spring	روشن Roshan
حساس Susceptible	حساس Susceptible	بهاره Spring	کرج ۱ Karaj1
حساس Susceptible	نیمه حساس Semi susceptible	بینابین Facultative	کرج ۲ Karaj2
حساس Susceptible	حساس Susceptible	بهاره Spring	شیراز Shiraz
حساس Susceptible	مقاوم Resistant	پاییزه Winter	گاسکوژن Gascoigne
حساس Susceptible	مقاوم Resistant	پاییزه Winter	گاسپارد Gaspard
حساس Susceptible	مقاوم Resistant	بهاره Spring	سایسون Saison
حساس Susceptible	حساس Susceptible	بینابین Facultative	قدس Ghods

صورت یک و صفر انجام گردید. برای ترکیبات آغازگری، تعداد نوارهای چند شکل، میزان اطلاعات چند شکلی<sup>۱</sup> (PIC) و شاخص نشانگر<sup>۲</sup> (MI) محاسبه گردید. شاخص نشانگر یا MI، یکی از شاخص‌های نشان دهنده قدرت تمایز نشانگرهای غالب است که PIC را بر اساس تعداد نوارهای چند شکل نشانگر، موازنه می‌کند. برای محاسبه PIC از فرمول  $PIC = 2f_i(1-f_i)$  استفاده شد که در آن  $f_i$  فراوانی نوار نام می‌باشد. شاخص PIC برای هر نوار ابتدا محاسبه و سپس از PIC کلیه نوارهای یک آغازگر میانگین گرفته شد (Roldain-Ruiz et al., 2000). شاخص MI از رابطه  $MI = EMR \times PIC$  و  $EMR = N_p$  از رابطه  $EMR = N_p$  محاسبه گردید که در آن  $N_p$ ، تعداد نشانگرهای چندشکل و  $N$ ، تعداد کل نشانگرها است (Powell et al., 1996). برای گروه‌بندی ارقام، از تجزیه خوشه‌ای براساس الگوریتم Neighbor-Joining و ضریب فاصله تکاملی P-distance در نرم افزار MEGA 5.05 استفاده گردید (Tamura et al., 2011).

### نتایج و بحث

چند شکلی نشانگرهای RGA: برای بررسی تنوع آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری در ارقام گندم نان و ارتباط آن با پاسخ به زنگ‌های زرد و قهوه‌ای از ۱۱ ترکیب آغازگری و آغازگر منفرد که براساس توالی نواحی حفاظت شده ژن‌های مقاومت به بیماری گیاهان با دامنه NBS-LRR طراحی شده بود، استفاده گردید (شکل ۱).



شکل ۱- توالی اسید آمینه‌ای دامنه حفاظت شده NBS در ژن‌های مقاومت به بیماری گیاهان با دامنه NBS-LRR.

Figure 1. Amino acid sequence of conserved NBS domain in plant disease resistant genes with NBS-LRR domain.

1- Polymorphic information content  
2- Marker index

جدول ۲- ترکیبات آغازگری استفاده شده برای تکثیر آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری در ارقام گندم نان.

Table 2. Primer combinations used to amplify resistance gene analogs in bread wheat varieties

آغازگر رفت	آغازگر معکوس	منشاء
(5'-3')	(3'-5')	Origin
Forward primer	Reverse primer	
(5'-3')	(3'-5')	
H2019	H2027	NBS
H2019	H2021	NBS
H2016	H1146	NBS
H2016	H2020	NBS
H2016	H2022	NBS
H2016	H2025	NBS
H2016	H2027	NBS
H1145	H2023	NBS
H1145	H2027	NBS
Cre3 gene 536-556	Cre3 gene 1040-1060	-
Loop-1	Loop-1	NBS

جدول ۳- توالی آغازگرها و ناحیه تکثیری توسط آن‌ها.

Table 3. Primer sequences and their amplification region.

آغازگر	مشخصات	توالی (5'-3')
Primer	Characteristics of primers	Sequence (5'-3')
Cre3 gene-536-556	-	TAC TGG ATG ATG TCT GGT* GCA
Cre3 gene-1040-1060	-	TGG CAG AAG GGT TCA TAA GAA GGI GGI RTI GGI AAI ACI AC
H1145	تکثیر NBS	GGT GGG GTT GGG AAG ACA ACG GGI GGI ATI GGI AAA ACI AC
H2016	تکثیر NBS	IAR IGY IAR IGG IAR ICC
H2019	تکثیر NBS	CAA CGC TAG TGG CAA TCC
H1146	تکثیر NBS	CAA NGC CAA NGG CAA NCC
H2021	تکثیر NBS	CAG NGC NAG NGG NAG NCC
H2020	تکثیر NBS	RAA IAR ISW RCA RTA IGC RAA
H2022	تکثیر NBS	YTC IGG RAA IAR IGC RCA RTA
H2025	Non-TIR	
H2027	Non-TIR	

\*علامت قراردادی به کار برده شده برای بازها براساس استانداردهای

IUPAC

\*Standard signs for bases based on IUPAC  
R: Purine (A or G); Y: Pyrimidine (T or C); W: A or T; S: G or C; M: A or C; K: G or T; H: A or T or C; B: G or C or T; V: G or A or C; D: G or A or T; N: G or A or T or C; I: Inosine

تجزیه داده‌ها: هر نوار چند شکل در الگوی نواری جفت

آغازگرها به عنوان یک نشانگر در نظر گرفته شد و

امتیازدهی بر اساس وجود و عدم وجود نوار به ترتیب به

ژن‌های مقاومت، نقش اساسی در مقاومت به پاتوژن‌ها بازی می‌کنند. هزاران RGA در ژنوم‌های توالی‌یابی شده گیاهان شناسایی شده‌اند. RGAهای شناسایی شده برای تهیه نقشه‌های پیوستگی،<sup>۱</sup> GWAS، مکان‌یابی QTL، همسازسازی ژن‌های مقاومت گیاهی استفاده شده‌اند (Sekhwal et al., 2015). آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت طیف گسترده‌ای از ژن‌های مقاومت را شامل می‌شوند. اما اکثر این ژن‌ها ناشناخته می‌باشند. بنابراین اولین گام برای استفاده از این ژن‌ها شناسایی و تعیین تنوع این ژن‌ها در ارقام زراعی و خویشاوندان نزدیک (زراعی و وحشی) آن‌ها می‌باشد (Ameline-Torregrosa et al., 2008; Arya et al., 2014). گو و همکاران (Gu et al., 2015) تکامل ژن‌های NBS-LRR را در گندم نان و خویشاوندان وحشی آن مورد بررسی و بیش از ۲۰۰۰ ژن دارای توالی NBS در گندم نان گزارش کردند. علاوه بر این، مشخص شد که *Ae. tauschii* (اهدا کننده ژنوم D) و *T. urartu* (اهدا کننده ژنوم A) به عنوان دو خویشاوندان وحشی گندم نان دارای بیشترین تعداد ژن‌های دامنه NBS بودند که نشان دهنده وجود ژن‌های دارای دامنه NBS در اجداد گندم می‌باشد.

چنگ و همکاران (Cheng et al., 2003) از ترکیب شش جفت آغازگر دژنره طراحی شده بر اساس دامنه‌های NBS، LRR و Kinase برای مطالعه روابط ژنتیکی ۱۲۰ ژنوتیپ از ۱۳ جمعیت گندم ایمر (*T. dicoccoides*) استفاده کردند. در مجموع، ۵۹۱ نشانگر با میانگین ۹۹ نشانگر به ازای هر ترکیب آغازگری تکثیر گردید. از این تعداد نشانگر، ۱۸۰ نشانگر (۳۰/۴ درصد) تک شکل، ۸۵ نشانگر (۱۴/۴ درصد) در درون جمعیت‌ها و ۳۲۶ (۵۵/۲ درصد) بین افراد نواحی مختلف چند شکل بودند. نسبت جایگاه‌های چند شکل به ازای هر جمعیت از ۰/۴۱۷-۰/۲۸۲ با میانگین ۰/۳۵۵ متغیر بود و میانگین تنوع ژنی، ۰/۱۲۹ و دامنه تغییرات آن بین ۰/۱۰۳ و ۰/۱۴۷ برآورد شد. در تحقیقی دیگر، ژن‌های رمز کننده پروتئین‌های

از ۱۱ ترکیب آغازگری مورد استفاده، ۶ ترکیب دارای تکثیر مناسب و قابل امتیازدهی بودند که برای بررسی تنوع ارقام مورد مطالعه استفاده شدند. با استفاده از شش ترکیب آغازگری در مجموع ۵۷ نشانگر چند شکل در ارقام مورد مطالعه تکثیر گردید. تعداد متوسط نشانگر به ازای هر ترکیب آغازگری، ۹/۵ بود و ترکیب آغازگری ۲۰۲۲-۲۰۱۶ و آغازگر منفرد Loop به ترتیب با تکثیر ۱۱ و ۸ قطعه ژنومی بیشترین و کمترین تعداد نشانگرهای چند شکل را تولید کردند. برای بررسی کارایی و قدرت تمایز نشانگرها از پارامترهای PIC و MI استفاده شد. مقادیر PIC برای نشانگرهای RGA مورد مطالعه در دامنه ۰/۲۸ تا ۰/۵۰ با میانگین ۰/۳۹ متغیر بود. آغازگر Loop و ترکیب آغازگری ۲۰۲۰-۲۰۱۶ به ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر PIC را به خود اختصاص دادند. دامنه تغییرات پارامتر MI بین ۲/۸۴ و ۴/۸۰ با میانگین ۳/۶۹ بدست آمد که حداکثر و حداقل به ترتیب مربوط به ترکیبات آغازگری ۲۰۱۶-۱۱۴۶ و ۲۰۱۶-۲۰۲۰ بود (جدول ۴).

جدول ۴- تعداد نشانگرهای تکثیر شده (N)، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) ترکیبات آغازگرهای مورد استفاده در ارقام گندم.

Table 4. Number of amplified markers (N), Polymorphic information content (PIC), Marker index (MI) of the primer combinations used in wheat varieties.

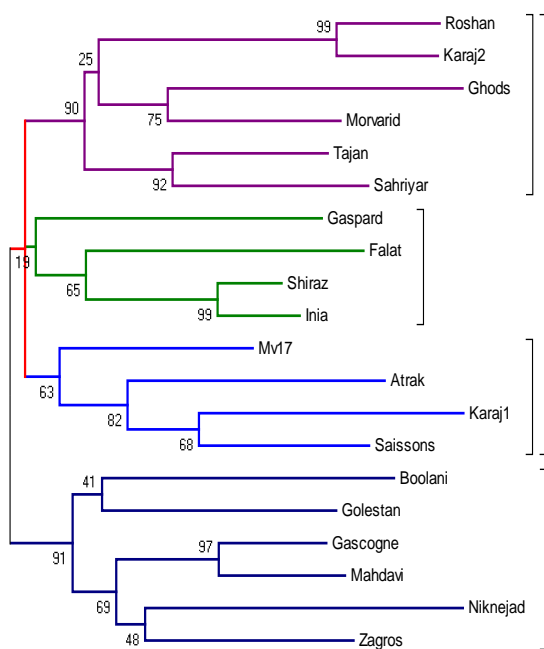
آغازگر Primer	N	PIC	MI
2016-2027	9	0.36	3.24
Loop	8	0.50	4.00
2016-1146	10	0.48	4.80
2016-2020	10	0.28	2.84
2016-2022	11	0.38	4.18
2025-2016	9	0.34	3.06
Mean میانگین	9.5	0.39	3.69

گیاهان مکانیسم‌های موثر توسعه یافته‌ای برای شناسایی و پاسخ به بیماری‌های حاصل از پاتوژن‌ها دارند و آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت گیاهی (RGAs) به عنوان نماینده

۱۰۰ رقم گندم پاکستانی با استفاده نشانگرهای RGA بررسی و ارتباط آن‌ها با مقاومت ارقام به زنگ زرد مطالعه گردید. سه ترکیب آغازگری مورد استفاده به ترتیب دارای درجه چند شکلی ۴۰، ۵۰ و ۵۷ درصد بودند. در مجموع ۲۲ نشانگر چند شکل برای ارقام مورد مطالعه ایجاد و از این نشانگرها برای شناسایی برخی از ژن‌های مقاومت به زنگ زرد مانند *Yr5*، *Yr8*، *Yr9*، *Yr15* و *Yr18* استفاده شد (Tabassum et al., 2010).

#### گروه‌بندی ارقام براساس داده‌های نشانگرهای RGA

تجزیه خوشه‌ای: برای گروه‌بندی ارقام مورد مطالعه، از الگوریتم Neighbor-Joining و ضریب فاصله تکاملی P-distance استفاده گردید. براساس این گروه‌بندی، ارقام گندم مورد مطالعه به چهار گروه منتسب شدند (شکل ۲).



شکل ۲- گروه‌بندی ارقام گندم نان براساس داده‌های نشانگرهای RGA با استفاده از الگوریتم Neighbor Joining و ضریب فاصله تکاملی P-distance

Figure 2. Grouping of bread wheat varieties based on RGA markers data using Neighbor-Joining algorithm and evolutionary P-distance coefficient

در دندروگرام حاصل، ارقام روشن، کرج ۲، قدس و مرواید، تجن و شهریار در یک گروه قرار گرفتند. همه این ارقام جز مرواید حساس به زنگ زرد هستند. از نظر

مقاومت به بیماری در ژنوم *T. urartu* تجزیه و ۵۹۳ آنالوگ ژن‌های مقاومت به بیماری شناسایی شد که از تعداد این ژن‌ها در برنج (۶۰)، ذرت (۱۰۶) و سورگوم (۲۱۱) بیشتر بود. در مقایسه با ژنوم جو، نسبت ژن‌های NBS-LRR در *T. urartu* (۱/۲۱ درصد) به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از جو (۰/۷۳ درصد) به دست آمد (Ling et al., 2013). این تجزیه و تحلیل‌ها نشان می‌دهد که گستره خاصی از آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت در ژنوم خویشاوندان وحشی گندم وجود دارد که برای مقابله با چالش‌های امنیت غذایی و کشاورزی پایدار مورد نیاز است. با وجود این که ارقام زراعی از نظر اکثر صفات دارای تنوع ژنتیکی پایینی در مقایسه با خویشاوندان وحشی خود هستند، نتایج تحقیق ما و تحقیقات مشابه نشان‌دهنده تنوع قابل قبول از نظر RGAها در ارقام زراعی گندم نان است. چن و همکاران (Chen et al., 1998) تنوع ژن‌های مقاومت به زنگ زرد را در ارقام اصلاح شده گندم با استفاده از نشانگرهای RGA بررسی و درصد چند شکلی را ۲۷ درصد گزارش کردند. آن‌ها علت پائین بودن تنوع آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت در ارقام مورد مطالعه، پایه ژنتیکی محدود آن‌ها بیان کردند که از نظر ژن‌های مقاومت به زنگ زرد دارای والد مشترک بودند. حبیب‌زاده و همکاران (Habibzadeh et al., 2007) برای بررسی تنوع ژن‌های مقاومت به بیماری در ۳۰ رقم گندم خارجی و داخلی مقاوم و حساس به زنگ زرد، پنج جفت آغازگر RGA و با سه سیستم الکتروفورز استفاده کردند. با استفاده از سه جفت از پنج جفت آغازگر مورد بررسی، در مجموع ۱۴۸۶ نشانگر تکثیر شد و درجه چندشکلی سه جفت آغازگر ۴۲، ۳۳ و ۳۹ درصد برآورد گردید. برای مطالعه کارایی نشانگرهای RGA در شش رقم گندم نان ترکیه‌ای مقاوم و حساس به زنگ زرد از ۷۷ جفت آغازگر استفاده شد که ۳۸ جفت آغازگر بین ارقام مقاوم و حساس چند شکل و بقیه تک شکل بودند و تنها یک جفت آغازگر تکثیر نشان نداد (Karakas et al., 2011). در مطالعه‌ای دیگر، تنوع ژنتیکی

سه بردار اول در مجموع ۵۲/۹۶ درصد از تغییرات نشانگرها را تبیین کردند که نشان دهنده وجود این نشانگرها از نواحی ژنومی خاص و کلاستر ژنی می‌باشد (جدول ۵). پراکنش ارقام گندم مورد مطالعه بر اساس دو بردار اصلی اول در شکل ۳ آورده شده است.

جدول ۵- درصد واریانس تبیین شده توسط سه بردار اصلی اول در تجزیه به بردارهای اصلی براساس داده‌های نشانگرهای RGA

Table 5. The percentage of variance explained by the three first principal components in principal coordinate analysis based on RGA marker data.

بردار سوم 3 <sup>rd</sup> coordinate	بردار دوم 2 <sup>nd</sup> coordinate	بردار اول 1 <sup>st</sup> coordinate	درصد
15.61	18.22	19.12	واریانس تبیین شده
52.96	37.35	19.12	مجموع واریانس‌ها
			Total variance

این گروه‌بندی تا حد زیاد با نتایج گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت. به طوری که در گروه‌های ۱ تا چهار به ترتیب ارقام اینیا، شیراز، کرج ۱، MV17 و سایسون؛ فلات، گاسکوژن، نیک‌نژاد، اترک و مروارید؛ مهدوی، شهریار، زاگرس، قدس، گلستان و تجن و کرج ۲، روشن و بولانی واقع شدند. این گروه‌بندی نیز تا حدودی متناسب با پاسخ به زنگ زرد ارقام بود.

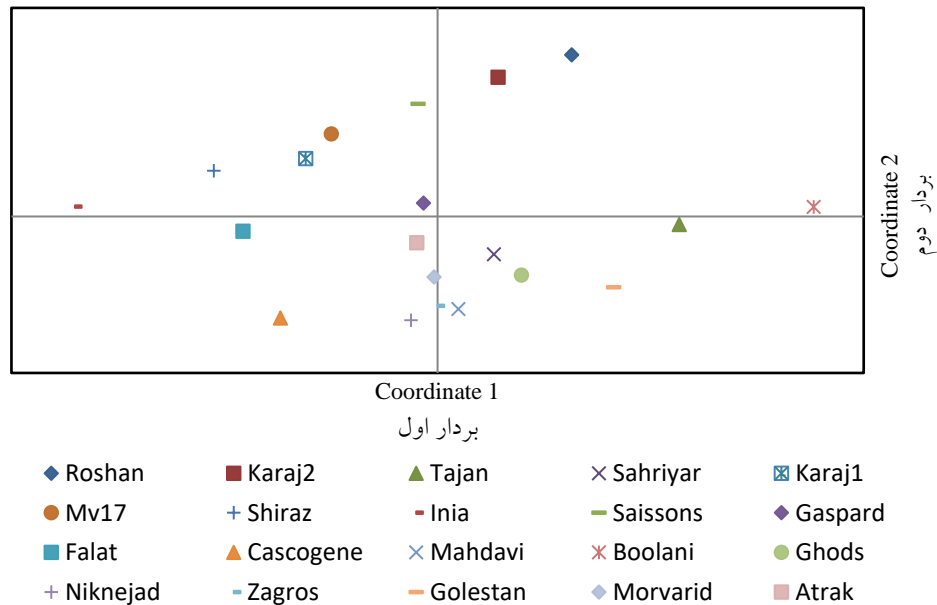
در سال‌های اخیر با توجه به در دسترس بودن توالی‌های ژنی، نشانگرهای متعددی بر مبنای توالی‌های ژنی جهت بررسی تغییرات و تنوع مولکول DNA طراحی شده است. اغلب این نشانگرها براساس نواحی حفاظت شده توالی‌های ژنی می‌باشند و هدف استفاده از آنها شناسایی اثر عوامل ژنتیکی مانند جهش در تغییر ساختار و در نتیجه عمل ژن می‌باشد.

پاسخ به زنگ قهوه‌ای، ارقام قدس، کرج ۲، روشن و شهریار، حساس و ارقام تجن و مهدوی، نیمه مقاوم می‌باشند. تیپ رشدی کلیه ارقام به غیر از شهریار که رقم زمستانه است بهاره و یا بینابین است. گروه بعدی شامل ارقام گاسپارد، فلات، شیراز و اینیا بود. در این گروه نیز به غیر از گاسپارد که یک رقم مقاوم به زنگ زرد است بقیه ارقام حساس به زنگ زرد می‌باشند. ارقام گاسپارد و شیراز، حساس؛ فلات، نیمه حساس و اینیا، مقاوم به زنگ قهوه‌ای هستند. چهار رقم MV17، اترک، کرج ۱ و سایسون با هم گروه‌بندی شدند که MV17، مقاوم به زنگ زرد و نیمه مقاوم به زنگ قهوه‌ای، اترک، حساس به زنگ زرد و مقاوم به زنگ قهوه‌ای، کرج ۱، حساس به زنگ زرد و قهوه‌ای و نهایتاً سایسون رقم مقاوم به زنگ زرد و حساس به زنگ قهوه‌ای می‌باشد. گروه آخر شامل بولانی، گلستان، گاسکوژن، نیک‌نژاد و زاگرس بود که بولانی و گلستان، حساس، مروارید و نیک‌نژاد، نیمه حساس و گاسکوژن و نیک‌نژاد مقاوم به زنگ زرد هستند. از نظر پاسخ به زنگ قهوه‌ای، بولانی و گاسکوژن حساس و بقیه مقاوم و نیمه مقاوم به زنگ قهوه‌ای می‌باشند.

حبیب زاده و همکاران (Habibzadeh et al., 2007) با بررسی تنوع اللی نواحی ژنومی ژن‌های مقاومت به زنگ‌های قهوه‌ای و زرد در گندم نان گزارش کردند که گروه‌بندی ارقام با استفاده از داده‌های ژن‌های *Lr* و براساس الگوریتم Maximum Evolution و ضریب فاصله تکاملی Jukes-Cantor، به دو گروه اصلی منتسب کرد که تا حدودی با پاسخ ارقام به زنگ قهوه‌ای مطابقت داشت. علاوه بر این، آنها از ۱۹ آغازگر SSR پیوسته با ژن‌های *Yr* نیز استفاده کردند که تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های نشانگرهای SSR با استفاده از الگوریتم Maximum Evolution و ضریب فاصله تکاملی Jukes-Cantor، ارقام را به چهار گروه منتسب کرد که این گروه‌بندی تا حدودی با پاسخ ارقام به هر دو زنگ مطابقت داشت.

تجزیه به بردارهای اصلی (PCoA): تجزیه به بردارهای اصلی نیز به عنوان مکمل تجزیه خوشه‌ای انجام گرفت.





شکل ۳- نمودار پراکنش ارقام گندم نان براساس دو بردار اول حاصل از تجزیه به بردارهای با استفاده از داده‌های RGA  
 Figure 3. Distribution plot of bread wheat varieties based on two first principal coordinates resulting for principal coordinate analysis using RGA data

استفاده قرار گیرند. با توجه به اینکه این نواحی در کلیه خانواده‌های ژنی حفاظت شده هستند، بنابراین آغازگرهای طراحی شده در کلیه گونه‌های گیاهی قابل استفاده می‌باشند.

#### سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی قطب علمی اصلاح مولکولی غلات دانشگاه تبریز انجام شده است.

آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری (RGAs) دارای نواحی حفاظت شده مانند NBS-LRR یا Kinase می‌باشند که اختصاصی خانواده‌های مختلف ژن‌های مقاومت به بیماری در گیاهان هستند، ولی الزاماً همه آن‌ها ژن‌های مقاومت به بیماری نیستند. نتایج این تحقیق نشان داد که آگارهای طراحی شده براساس نواحی حفاظت شده ژن‌های مقاومت به بیماری، می‌توانند به عنوان ابزارهای کارآمد در بررسی تنوع ژنتیکی و روابط بین ژنوتیپ‌ها مورد

#### References

- Ameline-Torregrosa, C., Wang, B.B., O'Bleness, M.S., Deshpande, S., Zhu, H., Roe, B., Young, N.D. and Cannon, S.B. (2008). Identification and characterization of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes in the model plant *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, **146**: 5-21.
- Arya, P., Kumar, G., Acharya, V. and Singh, A.K. (2014). Genome-wide identification and expression analysis of NBS-encoding genes in *Malus x domestica* and expansion of NBS genes family in Rosaceae. *PLoS ONE*, **9**: e107987.
- Bouktila, D., Khalfallah, Y., Habachi-Houimli, Y., Mezghani-Khemakhem, M., Makni, M. and Makni, H. (2014). Large-scale analysis of NBS domain-encoding resistance gene analogs in Triticeae. *Genetics and Molecular Biology*, **37**: 598-610.
- Chen, X.M. (2005). Epidemiology and control of stripe rust (*Puccinia striiformis* sp. tritici) on wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **27**: 314-337.
- Chen, J.Y., Huang, J.Q., Li, N.Y., Ma, X.F., Wang, J.L., Liu, C., Liu, Y.F., Liang, Y., Bao, Y.M. and Dai, X.F. (2015). Genome-wide analysis of the gene families of resistance gene analogues in cotton and their response to *Verticillium* wilt. *BMC Plant Biology*, **148**: 1-15.

- Chen, X.M., Line, R.F. and Leung, H.** (1998). Genome scanning for resistance gene analogue in rice, barley and wheat by high resolution electrophoresis. *Theoretical and Applied Genetics*, **97**: 345-355.
- Cheng, X., Jiang, H., Zhao, Y., Qian, Y., Zhu, S. and Cheng, B.** (2010). A genomic analysis of disease-resistance genes encoding nucleotide binding sites in *Sorghum bicolor*. *Genetics and Molecular Biology*, **33**: 292-297.
- Cheng, Y., Li, X., Jiang, H., Ma, W., Miao, W., Yamada, T. and Zhang, M.** (2012). Systematic analysis and comparison of nucleotide-binding site disease resistance genes in maize. *The FEBS Journal*, **279**: 2431-2443.
- Cheng, J.P., Yan, J. and Dahan, A.** (2003). Disease resistance gene analog polymorphism of wild emmer wheat population, Tenth International Wheat Genetics Symposium. Italy 1-6 September 2003.
- Cloutier, S., Mccallum, B.D., Loutre, C., Banks, T.W., Wicker, T., Feuillet, C., Keller, B. and Jordan, M.C.** (2007). Leaf rust resistance gene Lr1 isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large psr567 gene family. *Plant Molecular Biology*, **65**: 93-106.
- FAO.** (2017). FAO STAT. www.faostat.Fao.org.
- Fritz-Laylin, L.K., Krishnamurthy, N., Tor, M., Sjolander, K.V. and Jones, J.D.** (2005). Phylogenomic analysis of the receptor-like proteins of rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **138**: 611-623.
- Gill, B.S., Appels, R., Botha-Oberholster, A.M., Buell, C.R., Bennetzen, J.L., Chalhoub, B., Chumley, F., Dvorak, J., Iwanaga, M., Keller, B., Li, W., Mccombie, W.R., Ogihara, Y., Quetier, F. and Sasaki, T.** (2004). A workshop report on wheat genome sequencing: International Genome Research on Wheat Consortium. *Genetics*, **104**: 034769.
- Gu, L., Si, W., Zhao, L., Yang, S. and Zhang, X.** (2015). Dynamic evolution of *NBS-LRR* genes in bread wheat and its progenitors. *Molecular Genetics and Genomics*, **290**: 727-738.
- Habibzadeh, E., Keshavarzi, M., Afshari, F. and Naghavi, M.R.** (2007). Genetic diversity and disease resistance genes variation co-evaluation in wheat by RGA molecular marker. *Plant Diseases*, **3**: 327-337. (In Persian)
- Jia, J., Zhao, S., Kong, X., Zhao, G., He, W., Appels, R., Pfeifer, M., Tao, Y., Zhang, X. and Li, Y.** (2013). *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. *Nature*, **496**: 91-95.
- Jiang, H., Wang, C., Ping, L., Tian, D. and Yang, S.** (2007). Pattern of LRR nucleotide variation in plant resistance genes. *Plant Science*, **173**: 253-261.
- Karakas, O., Gurel, F. and Uncuoglu, A.A.** (2011). Assessment of genetic diversity of wheat genotypes by resistance gene analog-EST markers. *Genetics and Molecular Research*, **10**: 1098-1110.
- Kassa, M.T., You, F.M., Hiebert, C.W., Pozniak, C.J., Fobert, P.R., Sharpe, A.G., Menzies, J.G., Humphreys, D.G., Harrison, N.R., Fellers, J.P., McCallum, B.D. and McCartney, C.A.** (2017). Highly predictive SNP markers for efficient selection of the wheat leaf rust resistance gene Lr16. *BMC Plant Biology*, doi: 10.1186/s12870-017-0993-7.
- Leister, D., Ballvora, A., Salamini, F., and Gebhardt, C.** (1996). A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genetics*, **14**: 421-429.
- Ling, H.-Q., Zhao, S., Liu, D., Wang, J., Sun, H., Zhang, C., Fan, H., Li, D., Dong, L. and Tao, Y.** (2013). Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu*. *Nature*, **496**: 87-90.
- Liu, J., Liu, X., Dai, L. and Wang, G.** (2007). Recent progress in elucidating the structure, function and evolution of disease resistance genes in plants. *Journal of Genetics and Genomics*, **34**: 765-776.
- Ma, J.** (2015). Coordination of microRNAs, phasiRNAs, and *NB-LRR* genes in response to a plant pathogen: Insights from analyses of a set of soybean Rps gene near isogenic lines. *Plant Gene*, doi:10.3835/plantgenome2014.3809.0044.
- Maestra, B. and Naranjo, T.** (2000). Genome evolution in Triticeae. *Chromosomes Today*, **13**: 155-167.

- Mantovani, P., Van der Linden, G., Maccaferri, M., Sanguintei, M.C. and Tuberosa, R.** (2006). Nucleotide-binding site (NBS) profiling of genetic diversity in durum wheat. *Genome*, **49**: 1473-1480.
- Mace, E., Tai, S., Innes, D., Godwin, I., Hu, W., Campbell, B., Gilding, E., Cruickshank, A., Prentis, P. and Wang, J.** (2014). The plasticity of NBS resistance genes in sorghum is driven by multiple evolutionary processes. *BMC Plant Biology*, **14**: 253-266.
- McIntosh, R.A., Welling, C.R. and Park, R.F.** (1995). Wheat rusts: an atlas of resistance genes. CSIRO Melbourne, Australia, p.p. 200.
- O'Toole, N., Hattori, M., Andres, C., Iida, K., Lurin, C., Schmitz-Linneweber, C., Sugita, M. and Small, I.** (2008). On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. *Molecular Biology and Evolution*, **25**: 1120-1128.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A.** (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for gerplasm analysis, *Molecular Breeding*, **2**: 225-238.
- Reynolds, M., Moya, E.S., Molero, G., Vargas, M. and Payne, T.** (2012). Germplasm evaluation and delivery. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Workshop of the Wheat Yield Consortium, 12-15 March 2012. CIMMYT, Mexico, D.F.
- Richly, E., Kurth, J. and Leister, D.** (2002). Mode of amplification and reorganization of resistance genes during recent Arabidopsis thaliana evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **19**: 76-84.
- Roldain-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliland, T.J., Coll, R., van Eijk, M.J.T. and De Loose, M.** (2000). Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties. 2: AFLP characterization. *Molecular Breeding*, **6**: 593-602.
- Rommens, C.M. and Kishore, G.M.** (2000). Exploiting the full potential of disease resistance genes for agricultural use. *Current Opinion in Biotechnology*, **11**: 120-125.
- Saghai-Marooif, M.A., Soliman, K., Jorgensen, R.A. and Allard, R.W.** (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance/chromosome location and population dynamics. Proceeding of National Academic Science USA/ **81**: 8014-8018.
- Sekhwil, M. K., Li, P., Lam, I., Wang, X., Cloutier, S. and You, F. M.** (2015). Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**: 19248-19290.
- Shewry, P.R.** (2009). Wheat. *Journal of Experimental Botany*, **6**: 1537-1553.
- Singh, S., Chand, S., Singh, N.K. and Sharma, T.R.** (2015). Genome-wide distribution, organization and functional characterization of disease resistance and defense response genes across rice species. *PLoS ONE*, **10**: e0125964.
- Soriano, J. M., Vilanova, S., Llacer, C.R.G. and Badenes, M.L.** (2005). Characterization and mapping of NBS-LRR resistance gene analogs in apricot (*Prunusa rmeniaca* L.). *Theoretical Applied Genetics*, **110**: 980-989.
- Tabassum, S., Ashraf, M. and Chen, X.** (2010). Evaluation of Pakistan wheat germplasms for stripe rust resistance using molecular markers. *Science China Life Sciences*, **53**:1123-1134.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S.** (2011). MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software, version 5.0. *Molecular Biology Evolution*, **24**: 1596-1599.
- Wang, M., van den Berg, R., Van der Linden, G. and Vosman, B.** (2008). The utility of NBS profiling for plant systematics: a first study in tuber-breeding Solanum species. *Plant Systematics and Ecology*, **276**: 137-148.
- Wang, S.S., Wang, F., Tan, S.J., Wang, M.X., Sui, N. and Zhang, X.S.** (2014). Transcript profiles of maize embryo sacs and preliminary identification of genes involved in the embryo sac-pollen tube interaction. *Frontiers In Plant Science*, **5**: 702-716.
- Wei, H., Li, W., Sun, X., Zhu, S. and Zhu, J.** (2013). Systematic analysis and comparison of nucleotide-binding site disease resistance genes in a diploid cotton *Gossypium raimondii*. *PLoS ONE*, **8**, e68435.
- Wise, R.P.** (2000). Disease resistance: what's brewing in barley genomics? *Plant Disease*, **84**: 1160-1170.

## Diversity of Resistance Gene Analogues in Rust Resistance and Susceptible Bread Wheat Varieties

Faranak Khanmakoo<sup>1</sup>, Seyed Abolghasem Mohammadi<sup>2,\*</sup>, Robab Salami<sup>1</sup> and Saeed Aharizad<sup>2</sup>

1- Former M.Sc. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran

2- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran

(Received: April 18, 2017 – Accepted: January 11, 2018)

### Abstract

Fungal diseases, especially leaf and stripe rusts are wheat yield reducing factors in Iran and the world. In this study, genetic diversity of 20 wheat varieties with different response to leaf and stripe rusts were studied using primers designed based on the conserved regions of plant disease resistance genes. The banding patterns of polymorphic markers were scored as dominant and number of amplified bands and percentage of polymorphism were determined. In addition, for each primer combination, polymorphic information content (PIC) and marker index (MI) were calculated. Out of the 11 used single primers and primer combinations, five primer combinations and a single primer produced scorable amplification. The maximum and minimum of PIC were observed for LLOOP-1 and H2016-H2020 primer combination with mean value of 0.50 and 0.28, respectively. The primer combinations of H2016-H1146 and H2016-H2020 with mean values of 4.80 and of 2.84, had minimum and maximum of MI, respectively. Cluster analysis based on Neighbor-Joining algorithm and evolutionary P-distance coefficient assigned the varieties into four groups which were in agreement with their response to yellow rust. In principal coordinate analysis, the scatter plot of varieties based on two first coordinates confirmed the groups obtained from cluster analysis.

**Keywords:** Resistance gene analogues, Genetic diversity, Yellow rust, Leaf rust

---

\* Corresponding Author, E-mail: mohammadi@tabrizu.ac.ir