

دانش گیاهپزشکی ایران

دوره ۴۵، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳ (ص ۲۵۰-۲۴۱)

واکنش گیاهچه‌ای و گیاه کامل تعدادی از لاین‌های امیدبخش گندم

نسبت به بیماری زنگ زرد

صفرعلی صفوی^{۱*} و فرزاد افشاری^۲

۱. استادیار پژوهش بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل،

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اردبیل

۲. استاد پژوهش موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۱۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۷/۲۳)

چکیده

زنگ زرد گندم با عامل *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* بیماری مهمی است که تولید گندم در سراسر جهان را تهدید می‌کند. مقاومت میزبانی، اقتصادی‌ترین روش مدیریت زنگ زرد است. برای این منظور ۱۸ لاین امیدبخش گندم مربوط به اقلیم معتدل همراه با شاهد حساس برای بررسی مقاومت مرحله گیاهچه‌ای و گیاه کامل نسبت به زنگ زرد ارزیابی شد. واکنش گیاهچه‌ای در شرایط گلخانه‌ای با استفاده از نژاد 6E150A+, Yr27 ارزیابی شد. واکنش گیاه کامل نیز با اندازه‌گیری شدت نهایی بیماری (FRS) و ضریب آلودگی (CI) تحت شرایط آلودگی طبیعی با دوبار آلودگی مصنوعی ارزیابی گردید. آلودگی مصنوعی با مایه‌زنی اینوکولوم زنگ زرد که دارای ویروالانس بر روی ژن‌های *Yr2*, *Yr6*, *Yr7*, *Yr9*, *Yr22*, *Yr23*, *Yr24*, *Yr25*, *Yr26*, *Yr27*, *YrA* و *YrSU* بود، انجام گرفت. آزمایش مزرعه‌ای بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در ایستگاه تحقیقات کشاورزی اردبیل طی سال زراعی ۱۳۹۰-۹۱ انجام گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که لاین‌های M-90-15 و M-90-18 همراه با شاهد حساس بیشترین مقدار FRS و CI را داشتند. لاین‌های M-90-2، M-90-4، M-90-5، M-90-7، M-90-8، M-90-13 و M-90-17 در مرحله گیاهچه‌ای حساس و در مرحله گیاه کامل مقادیر پایین FRS و CI را نشان دادند. بنابراین، این لاین‌ها بر اساس نتایج این تحقیق و اطلاعات شجره‌ای آنها درجات متفاوتی از مقاومت پایدار دارند. بقیه لاین‌ها که در مرحله گیاه کامل و گیاهچه‌ای مقادیر پایین آلودگی را نشان دادند، به عنوان لاین‌های نیمه‌مقاوم یا مقاوم انتخاب شدند.

واژه‌های کلیدی: زنگ زرد، گندم، گیاهچه‌ای، مقاومت، مقاومت پایدار، مقاومت گیاه کامل.

مقدمه

Westend. f.sp. *tritici* Eriksson یکی از بیماری‌های مهمی است که در بیشتر نقاط جهان وجود دارد و در صورت کنترل نشدن با ارقام مقاوم یا قارچ‌کش‌ها، باعث کاهش چشمگیر عملکرد می‌شود. در بیشتر نواحی گندم‌خیز دنیا کاهش عملکرد ناشی از زنگ زرد ۷۰-۱۰

زنگ‌های غلات شامل زنگ سیاه، زنگ قهوه‌ای و زنگ زرد همچنان به عنوان عوامل اصلی و مهم محدودکننده تولید گندم در قسمت‌های مختلف جهان به‌شمار می‌روند (Singh *et al.*, 2011). زنگ‌زدگندم با عامل *Puccinia striiformis*

(Line & Chen, 1995). دو نوع مقاومت کیفی و کمی در چندین پاتوسیستم زنگ- غلات گزارش گردیده است (Sandoval-Islas *et al.*, 2007). به کارگیری ژن‌های مقاومت کیفی (اختصاص - نژادی) کنترل مؤثر و کاملی در برابر بیماری فراهم می‌آورد (Shah *et al.*, 2010); اما این نوع مقاومت که به تشخیص اختصاصی بین فرآورده ژن مقاومت میزبان (*R*) و فرآورده ژن غیربیماری‌زایی پاتوژن (*Avr*) بستگی دارد، از تئوری ژن برای ژن (Flor, 1956) پیروی می‌کند و این نوع مقاومت پایدار نیست و به زودی شکسته می‌شود (Boyd, 2005). برخلاف مقاومت کیفی، مقاومت کمی (غیراختصاص - نژادی) اساساً چندژنی بوده و اغلب به عنوان مقاومت تدریجی یا مقاومت نسبی تعریف شده (Parlevliet, 1979) و مقاومت پایداری است (Herrera-Fossel *et al.*, 2007).

تاکنون تقریباً ۵۳ ژن مقاومت *Yr* برای مقاومت به زنگ زرد گندم شناسایی و به کار گرفته شده است (deVallavieille-Pope *et al.*, 2012). با وجود این، بیشتر این ژن‌ها اختصاص - نژادی‌اند و در کنترل جمعیت‌های پاتوژن در نتیجه ظهور نژادهای جدید غیرمؤثر خواهند شد. میانگین طول عمر ژن‌های مقاومت اختصاص - نژادی در سطح جهانی پنج سال برآورد می‌گردد (Kilpatric, 1975). برای مثال، ژن‌های مقاومت *Yr2*, *Yr3*, *Yr4*, *Yr6*, *Yr7*, *Yr9* و به‌طور وسیعی در برنامه‌های به‌نژادی سیمیت (CIMMYT) به کار گرفته شده‌اند (Badebo *et al.*, 1990). اما هیچ‌یک از این ژن‌ها در سطح جهانی مؤثر نیستند (Broers *et al.*, 1996; Sharma-Poudyal *et al.*, 2013). دو نوع از مقاومت کمی یعنی مقاومت تدریجی و مقاومت گیاه کامل در درجه حرارت بالا (High Temperature Adult Plant) HTAP (=) به‌طور وسیعی بررسی شده‌اند (Line, 2002). در بسیاری از پاتوسیستم‌های زنگ - غلات، مفاهیم کمی مقاومت ارقام تشریح شده و مقادیر آن در مرحله گیاه کامل با اندازه‌گیری شدت بیماری در مرحله مشخصی از رشد گیاه، سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC)، نرخ آلودگی ظاهری و متوسط ضریب آلودگی برآورد می‌شود (Broers *et al.*, 1996; Pathan & Park, 2006). محققان مختلفی با استفاده از این پارامترها مقادیر کمی مقاومت ارقام و لاین‌ها را در

تخمین زده می‌شود (Chen, 2005). این بیماری در کشورهای آسیای مرکزی از اواخر ۱۹۹۰ و اوایل ۲۰۰۰ بیماری غالب محسوب می‌گردید و در سال ۱۹۹۹-۲۰۰۰ باعث کاهش ۲۰-۴۰ درصد محصول گندم شد (Morgonov *et al.*, 2004). در صورت ظهور زود هنگام بیماری و ادامه آن طی فصل رشد و به شرط کشت ارقام حساس، بیماری می‌تواند تا ۱۰٪ نیز خسارت بزند (Afzal *et al.*, 2007). در ترکیه در سال‌های ۱۹۹۱ و ۱۹۹۸ خسارت این بیماری روی رقم Gerek 79 به ترتیب ۲۶/۵ و ۵۰ درصد برآورد شده است (Braun & Sarri, 1992). در کشور سوریه نیز طی ۱۰ سال گذشته همه‌گیری‌های متعدد زنگ زرد گزارش شده است که شدیدترین آن مربوط به سال ۱۹۹۸ بوده است. این بیماری در سال ۱۹۹۴، ۳۰٪ کل محصول این کشور را که عمدتاً با کشت ارقام Seri 82 و Mexipak تأمین می‌شد، از بین برد (Mamluk & El-Naimi, 1992; Mamluk *et al.*, 1989). هزینه کنترل بیماری زنگ زرد گندم در کشور استرالیا نیز حدود ۱۳۹ میلیون دلار استرالیا تخمین زده شده است (Brennan & Murray, 1988). طی دهه‌های گذشته چندین اپیدمی از بیماری در بیشتر نواحی گندم‌خیز ایران نیز گزارش شده است. برای مثال در سال‌های ۱۹۹۳ و ۱۹۹۵ به ترتیب باعث کاهش عملکرد ۱/۵ و ۱ میلیون تن از محصول گندم گردید (Torabi *et al.*, 1995).

تا قبل از سال ۲۰۱۰، مطالعات زیادی برای شناسایی میزبان واسط در چرخه زندگی زنگ زرد انجام گرفته بود و در هیچ‌کدام از این مطالعات میزبان واسطی برای زنگ زرد شناسایی نشد تا اینکه Jin *et al.* (2010)، برای اولین بار بیان کردند چرخه جنسی قارچ *P. striiformis* بر روی گیاه زرشک اتفاق می‌افتد و این گیاه نقش اساسی در تولید ترکیبات جدید بیماری‌زایی این قارچ دارد.

امروزه کنترل بیماری زنگ زرد با قارچ‌کش‌های جدید و مؤثری مانند تیلت (Tilt)، کوادریس (Quadris)، استراتگو (Stratego)، هدلاین (Headline) و کوپلت (Quilt) امکان‌پذیر شده است (Chen, 2005). با وجود این، کشت ارقام مقاوم مؤثرترین، اقتصادی‌ترین و از لحاظ محیطی سالم‌ترین روش کنترل بیماری است

مواد و روش‌ها

برای بررسی واکنش گیاهچه‌ای، ۱۸ لاین امیدبخش دریافتی از مؤسسه تحقیقات اصلاح بذر کرج (جدول ۱) که دارای خصوصیات مطلوب زراعی بودند، همراه با شاهد حساس (بولانی) در این پژوهش استفاده شدند. واکنش گیاهچه‌ای در گلخانه بخش غلات کرج بررسی شد. برای این منظور هر لاین در گلدانی (۵ بذر در هر گلدان) که حاوی ترکیب خاک، پیت ماس و شن به نسبت‌های ۵:۵:۷ بود، کاشته شد. ده روز بعد از کاشت گلدان‌ها مایه زنی با نژاد 6E150A+, Yr27 از طریق اسپورپاشی گیاهچه‌ها با مخلوط اسپور و پودر تالک (به نسبت ۱ به ۴) انجام گرفت. گلدان‌ها به مدت ۲۴ ساعت در اتاق تاریک در ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس به گلخانه‌ای با درجه حرارت ۱۵-۱۸ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل گردیدند. ۱۷-۱۴ روز بعد از مایه‌زنی، واکنش گیاهچه‌ای بر اساس معیار ۹-۰ به روش لاین و قیوم (Line & Qayoum, 1992) یادداشت‌برداری شد. در این روش تیپ‌های آلودگی ۷ یا بیشتر به عنوان حساس و تیپ‌های آلودگی ۶-۴ متوسط و تیپ‌های آلودگی کمتر از ۴ به عنوان مقاوم در نظر گرفته شدند.

بررسی مزرعه‌ای در سال زراعی ۹۱-۱۳۹۰ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی اردبیل (واقع در فاصله ۱۵ کیلومتری جنوب غربی جاده اردبیل- خلخال با طول جغرافیایی ۴۸ درجه و ۲۶ دقیقه و عرض جغرافیایی ۳۸ درجه و ۲۲ دقیقه و ارتفاع از سطح دریا ۱۳۳۹ متر) به اجرا درآمد.

هر کدام از لاین‌ها به میزان ده گرم روی دو خط یک متری با فاصله ۳۰ سانتی‌متر از همدیگر روی یک پشته کاشته شدند و بعد از هر پنج رقم و نیز در کل حاشیه آزمایش روی دو خط یک متری (یک پشته) رقم حساس بولانی کشت شد. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام گرفت و در طول فصل زراعی عملیات داشت شامل آبیاری غرقابی (یک بار در فصل پاییز و ۶ بار در فصل بهار با فاصله هر ده روز یکبار)، وجین علف‌های هرز، کودپاشی و دوبار اسپورپاشی انجام گرفت. عملیات مایه‌زنی مصنوعی خزانه در فاصله میان زمان ساقه‌دهی تا قبل از ظهور برگ پرچم (Gs 36) با

سطح مزرعه مشخص کرده‌اند (Sandoval-Islas *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2009 b; Shah *et al.*, 2010; Safavi *et al.*, 2010). در بررسی‌های این محققان، همبستگی بالای پارامترهای شدت نهایی بیماری، ضریب آلودگی و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری با یکدیگر مشخص شده است.

در زمینه ارزیابی مقاومت ارقام و لاین‌های گندم نسبت به زنگ زرد از سال‌ها پیش تاکنون تحقیقات متعددی در ایران انجام گرفته است. Saidi *et al.* (1998)، در ارزیابی مقاومت ۳۸ لاین و رقم پیشرفته نسبت به ۳ نژاد زنگ زرد در مرحله گیاهچه‌ای از اجزای مقاومت یادداشت‌برداری کردند که بر این اساس اغلب لاین‌ها مقاومت خوبی نسبت به نژادهای به‌کاررفته نشان دادند. این ارقام از نظر تیپ آلودگی و دوره نهان آلودگی تفاوت معناداری با هم داشتند و تعدادی از این لاین‌ها مقاومت بالایی را نسبت به این ۳ نژاد که از نظر ویرولانس متفاوت بودند نشان دادند. در تحقیق دیگری، مقاومت نسبی ۲۶ لاین امیدبخش گندم اقلیم سرد با اندازه‌گیری پارامترهای مختلف تحت شرایط آلودگی مصنوعی و طبیعی در اردبیل بررسی شد و مشخص شد که لاین‌های C-89-16، C-89-4 و C-89-17 همراه با شاهد حساس بیشترین مقدار شدت نهایی زنگ (Final Rust Severity=FRS)، مقدار نسبی سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (rAUDPC) و ضریب آلودگی (CI) را داشتند. لاین‌های C-89-7، C-89-8، C-89-9، C-89-10، C-89-13، C-89-14 و C-89-20 در مرحله گیاهچه‌ای حساس و در مرحله گیاه کامل مقادیر پایین FRS، rAUDPC و CI نشان دادند (Safavi & Afshari, 2012).

دوام مقاومت به زنگ‌های غلات به شناسایی و استفاده از منابع مقاومت پایدار، یا استفاده از منابع مقاومت جدید در ترکیب با ژن‌های مقاومت مؤثر بستگی دارد (Bariana & McIntosh, 1995). در این راستا پژوهش حاضر به منظور تعیین میزان مقاومت ۱۸ لاین امیدبخش گندم اقلیم معتدل انجام گرفت تا منابع مقاومت جدید به منابع مقاومت قبلی افزوده شوند و در صورت دارا بودن صفات مطلوب دیگر و مقاومت پایدار احتمالاً معرفی خواهند شد.

آلودگی) بر اساس روش Roelfs *et al.* (1992) یادداشت‌برداری شد. سپس داده‌های مربوط به شدت بیماری و عکس‌العمل میزبان با هم ترکیب شدند و از ترکیب آنها ضریب آلودگی محاسبه گردید. ضریب آلودگی از ضرب شدت بیماری در ثابت مربوط به عکس‌العمل میزبان ($immune=0.0$, $R=0.2$, $MR=0.4$, $M=0.6$) (Stubbs *et al.*, 1986) به دست آمد ($MS=0.8$, $S=1$). داده‌های به دست آمده از ضریب آلودگی و شدت نهایی بیماری با استفاده از نرم‌افزار MSTATc تجزیه واریانس شده و معنادار بودن میزان آلودگی لاین‌ها با مقایسه میانگین آنها مشخص شد.

مخلوط اسپور زنگ زرد (که در فصل زراعی سال قبل جمع‌آوری و در یخچال نگهداری شده بودند) و پودر تالک به کمک گردپاش و در هنگام غروب انجام گرفت. آلودگی مصنوعی با مایه‌زنی اینوکولوم زنگ زرد که دارای ویروالانس بر روی ژن‌های *Yr2*, *Yr6*, *Yr7*, *Yr9*, *Yr22*, *Yr23*, *Yr24*, *Yr25*, *Yr26*, *Yr27* و *YrA* و *YrSU* بود، انجام گرفت. یادداشت‌برداری از شدت بیماری زنگ زرد در دو نوبت و به فاصله هر ۷ روز یک‌بار از زمان ظهور برگ پرچم (Gs47) تا مرحله گل‌دهی (Gs69) بر اساس مقیاس اصلاح‌شده کاب پیشنهادی Peterson *et al.* (1948) انجام گرفت. همچنین از واکنش گیاه (تیپ

جدول ۱. مشخصات لاین‌های امیدبخش گندم تحت بررسی در این مطالعه

No.	Lines	Parentage
1	M-90-1	Dove's"/Buc's"/2*Darab
2	M-90-2	Kauz "s" / Azadi
3	M-90-3	Pishtaz/Lov24/Coc 75
4	M-90-4	Pishtaz/Lov24/Coc 75
5	M-90-5	Pishtaz/3/Jup/Bjy"s"/Kauz"s"
6	M-90-6	Pishtaz/Falat/Barakat
7	M-90-7	Bow"s"/Vee"s"/1-60-3/3/Cocoraque 75/4/Chamran
8	M-90-8	4771//Fkn/Gb/3/Vee "s"/Vee "s"/4/Buc "s"/5/1-66-44/6/Nanjing 8343/Kauz
9	M-90-9	IR/FR (Aldric)
10	M-90-10	IR/FR (FD03142)
11	M-90-11	PFAU/MILAN/FISCAL
12	M-90-12	Gv/Ald "s"/5/Ald "s"/4/Bb/Gil/Cno.../6/Marv4
13	M-90-13	NAC/TH.AC//3*PVN/3/MIRLO/BUC/4/2*PASTOR
14	M-90-14	VORB/FISCAL
15	M-90-15	PRL/2*PASTOR
16	M-90-16	SHARP/3/PRL/SARA//TSI/VEE#5/5/VEE/LIRA//BOW/3/BCN/4/KAUZ
17	M-90-17	WAXWING*2/TUKURU
18	M-90-18	WBL1*2/BRAMBLING
19	Check	Bolani

نتایج و بحث

مزرعه‌ای در سال ۱۳۹۱ ملاحظه شد که آلودگی بسیار خوبی در خزانه مستقر شده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای ضرایب آلودگی و شدت نهایی بیماری، بیانگر تفاوت معنادار بین لاین‌ها در سطح احتمال ۱٪ بود (جدول ۲). در مقایسه میانگین ضریب آلودگی لاین‌ها مشخص شد که از ۱۸ لاین بررسی شده، لاین‌های M-90-15 و M-90-18 همراه با شاهد حساس بیشترین مقدار FRS و CI را دارند. لاین‌های M-90-2

نتایج حاصل از بررسی واکنش گیاهچه‌ای نشان داد که از ۱۸ لاین بررسی شده M-90-2، M-90-4، M-90-5، M-90-7، M-90-8، M-90-13، M-90-17 و M-90-18 دارای واکنش حساسیت (۹-۷) در مرحله گیاهچه‌ای (جدول ۲) و لاین‌های M-90-3، M-90-6، M-90-15 دارای واکنش متوسط‌اند (۶-۴) و بقیه لاین‌ها واکنش مقاومت نشان دادند. با مشاهده میزان آلودگی لاین حساس در شرایط

M-90-4, M-90-5, M-90-7, M-90-8, M-90-13 و M-90-17 در مرحله گیاهچه‌ای حساس و در مرحله گیاه کامل مقادیر پایین FRS و CI نشان دادند. بقیه لاین‌ها که در مرحله گیاه کامل و گیاهچه‌ای مقادیر پایین آلودگی نشان دادند، به عنوان لاین‌های نیمه‌مقاوم تا مقاوم انتخاب شدند.

جدول ۲. داده‌های مربوط به واکنش مرحله گیاه کامل (در اردبیل) و گیاهچه‌ای (در گلخانه کرج) در تعدادی از لاین‌های امیدبخش گندم نسبت به زنگ زرد

No.	Lines	Seedling reaction	Adult plant reaction	Values of field-based parameters*	
				Final rust severity	Coefficient of Infection
1	M-90-1	0	MR	13.3 cde	5.3 cd
2	M-90-2	7	M	16.6 cde	12 bcd
3	M-90-3	6	MR	13.3 cde	5.3 cd
4	M-90-4	7	MR	20 bcd	9.3 cd
5	M-90-5	7	MR	23.3 bcd	13.3 bcd
6	M-90-6	6	M	23.3 bcd	14 bcd
7	M-90-7	7	MR	10 de	4 cd
8	M-90-8	8	MR	13.3 cde	5.3 cd
9	M-90-9	0	MR	1 e	0.3 d
10	M-90-10	0	R	1 e	0.2 d
11	M-90-11	0	MR	7 de	2.7 cd
12	M-90-12	0	R	7 de	2.7 cd
13	M-90-13	7	MS	20 bcd	17 bc
14	M-90-14	0	M	16.6 bcde	10.6 cd
15	M-90-15	6	MS	33.3 b	27.3 b
16	M-90-16	0	MS	16.6 bcde	8 cd
17	M-90-17	7	MR	20 bcd	11.3 bcd
18	M-90-18	8	M	30 bc	16 bcd
19	Check	8	S	100 a	100 a

*: اختلاف بین میانگین‌های هر ستون که دارای حرف مشترک نیستند با آزمون دانکن در سطح ۱٪ معنادار است.

دارد مقاومت این لاین‌ها به علت ژن‌های مقاومت اختصاص- نژادی بوده باشد، یا به دلیل اثر افزایشی چند ژن مقاومت بزرگ‌اثر باشد که به صورت اختصاص- نژادی عمل می‌کنند (Johnson, 1988). با توجه به تجربه سال‌های قبل، لاین‌هایی که دارای ژن‌های مقاومت اختصاص-نژادی باشند، احتمال شکست آنها در اثر تغییر ویروالانس عامل بیماری بالا خواهد بود (Nazari *et al.*, 2000b). بنابراین در انتخاب چنین لاین‌هایی باید دقت کرد تا در صورت وجود ژن‌های مقاومت دیگر (به‌ویژه مقاومت پایدار) آنها به عنوان منبع مقاوم معرفی شوند. برای اثبات وجود ژن‌های دیگر به آزمایش‌های دقیق تجزیه ژنتیکی یا استفاده از مارکرهای مولکولی نیاز خواهد بود.

احتمال اینکه لاین‌های دارنده آلودگی متوسط (واکنش MR یا M) دارای ژن‌های کوچک‌اثر باشند و به صورت افزایشی عمل کنند، بالا است (Nazari *et al.*,

روش مقایسه ضریب آلودگی به علت همبستگی با کاهش محصول در اثر آلودگی به زنگ‌های غلات به عنوان یکی از روش‌های مناسب ارزیابی ذکر شده است (McIntosh *et al.*, 1995). علاوه بر واکنش گیاه کامل، به منظور قضاوت در خصوص مقاومت نسبی یا پایدار لاین‌های تحت بررسی، واکنش گیاهچه‌ای نیز تحت شرایط گلخانه‌ای بررسی شد. در بررسی‌های متعددی همبستگی بالای ضریب آلودگی و شدت نهایی بیماری با rAUDPC ثابت گردیده است (Sandoval-Islas *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2010; Safavi *et al.*, 2010). AUDPC معیار کمی از کل مقاومت بوده و همه مؤلفه‌های مقاومت نظیر فراوانی آلودگی، دوره نهان آلودگی، اندازه اردیوم و اسپورزایی را در یک سطح مشخص می‌کند (Milus & Line, 1986).

درباره لاین‌هایی که در این بررسی آلودگی جزئی داشتند، یا اصلاً آلودگی نداشتند، می‌توان گفت احتمال

و به علت دارا بودن ژن اختصاص- نژادی *Yr31* و دو ژن غیراختصاص- نژادی *Yr29* و *Yr30* دارای مقاومت نسبی در برابر زنگ زرد هستند (Singh et al., 2003). ژن *Yr30* نیز با ژن *Sr2* پیوستگی دارد که تنها ژن دارای مقاومت پایدار نسبت به زنگ سیاه است (Chen, 2005; Singh et al., 2011). لاین‌های M-90-15, M-90-13 همچنین رقم *Nacozari* را در شجره خود دارند که به علت داشتن ژن مقاومت *Lr34* همراه با ژن دیگر مسئول مقاومت تدریجی‌اند. بنابراین لاین‌های مذکور می‌توانند در صورت دارا بودن صفات مطلوب زراعی به عنوان منبع مقاومت انتخاب شوند، یا برای معرفی مستقیماً کاندیدا گردند.

لاین‌های M-90-7 و M-90-17 به ترتیب به علت دارا بودن رقم چمران و *Tukuru* در شجره خود، ژن‌های مقاومت تدریجی یا گیاه کامل زیادی دارند. در شجره رقم چمران رقم *Attila* به کار رفته است که دارای دو ژن مقاومت نسبت به زنگ قهوه‌ای و سه ژن مقاومت نسبت به زنگ زرد است (Singh et al., 2005). بنابراین از مقاومت پایداری در برابر زنگ زرد و زنگ قهوه‌ای برخوردار خواهد بود. رقم *Tukuru* که در شجره لاین M-90-17 به کار رفته است، دارای ژن *Lr34* همراه با سه یا چهار ژن دیگر مقاومت گیاه کامل نسبت به زنگ قهوه‌ای و نیز ژن *Yr18* همراه با سه یا چهار ژن دیگر مقاومت گیاه کامل در برابر زنگ زرد است (Singh et al., 2005). بنابراین این لاین (M-90-17) دارای مقاومت پایدارتری در برابر هر دو بیماری زنگ زرد و قهوه‌ای نسبت به دیگر لاین‌ها خواهد بود. از طرف دیگر، بر اساس نتایج Singh et al. (2011)، تجمیع ۴-۵ ژن مقاومت گیاه کامل در یک گیاه موجب پایداری مقاومت رقم در برابر تغییرات پاتوژن است و به زودی شکسته نمی‌شود.

با توجه به پتانسیل بالای عامل بیماری در ایجاد نژادهای جدید به دلیل مهاجرت آسان در مسافت‌های طولانی، انتشار وسیع، موتاسیون، فشار انتخابی میزبان روی پاتوژن (Hovmoller, 2001; Ben Yehuda et al., 2004; Wan & Chen, 2012) و احتمالاً نقش زرشک به عنوان میزبان واسط (Jin, 2011)، توصیه می‌گردد که در انتخاب مواد و معرفی آنها بر مقاومت پایدار تأکید شود. مقاومت تدریجی و مقاومت HTAP از این نوع

(2000b; Singh et al., 2005; El-Naimi et al., 2001) در این لاین‌ها احتمال وجود ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت تدریجی و ژن‌های مقاومت گیاه کامل در درجه حرارت بالا (HTAP) زیاد است. از آنجا که این نوع مقاومت‌ها به دلیل اثر افزایشی ژن‌ها مدت زمان زیادی دوام می‌آورند (Shultz et al., 1992; Dehghani & Moghaddam, 2004)، بایستی بیشتر مورد توجه قرار گیرند. همان‌طور که درباره لاین‌های کاملاً مقاوم نیز اشاره شد، برای اثبات وجود ژن‌های مقاومت HTAP و مقاومت تدریجی آزمایش‌ها، تجزیه ژنتیکی دقیق، یا استفاده از مارکرهای مولکولی ضروری است.

لاین‌هایی که آلودگی بالایی (ضریب آلودگی بیشتر از ۲۰) دارند، برای انتخاب به عنوان منبع مقاومت و معرفی توصیه نمی‌گردند (Nazari et al., 2000b; Ali et al., 2009a).

لاین‌هایی که در شجره آنها رقم *Kauz* وجود دارد، ژن *Yr9* دارند (McIntosh et al., 1995). این لاین‌ها با وجود مؤثر نبودن ژن *Yr9* نسبت به نژاد یا نژادهای اردبیل (Safavi et al., 2013)، در مرحله گیاه کامل نیمه‌مقاوم یا نیمه‌حساس قرار دارند. این حالت بیانگر وجود ژن‌های دیگری در این لاین‌ها است. در شجره لاین M-90-5 *Jupateco 73R* وجود دارد (جدول ۱). رقم مذکور به دلیل دارا بودن ژن‌های مقاومت *Yr18* و *Lr34* که به ترتیب مسئول مقاومت تدریجی نسبت به زنگ زرد و زنگ قهوه‌ای‌اند (Singh et al., 2005) و نیز ژن *Bdv1* که نسبت به ویروس کوتولگی زرد جو مقاوم است (Singh et al., 1993)، دارای اهمیت است. بنابراین لاین‌های دارنده رقم مذکور باید مورد توجه باشند، زیرا ژن‌های یادشده با یکدیگر (Singh et al., 1993) و با نکرور نوک برگ پیوستگی دارند (Singh, 1992) و در صورتی که لاین‌های حامل رقم *Jupateco 73R* در شجره خود از ژن‌های دیگر مقاومت تدریجی و نیز ژن‌های مقاومت HTAP برخوردار باشند، از مقاومت پایداری برخوردار خواهند بود.

در شجره لاین‌های M-90-15, M-90-13 *Pastor* به کار رفته است (جدول ۱). این رقم به علت ترکیب ژن‌های *Lr3*, *Lr23*, *Lr10* همراه با یک ژن مقاومت نسبی دارای مقاومت مطلوبی برای زنگ قهوه‌ای

مؤثرند (Sharma-Poudyal *et al.*, 2013) و تا به حال بیماری‌زایی برای این ژن‌ها گزارش نشده است. از ژن‌های مقاومت غیراختصاص- نژادی می‌توان به ژن‌های Yrns-B1 و YrA1-A8, Yr36, Yr29, Yr30, Yr18 اشاره کرد (Chen, 2005). برخی از این ژن‌ها در شجره ارقام و لاین‌های ایرانی وجود دارند، اما برای پایداری مقاومت بهتر است ۴-۵ ژن از این ژن‌ها با یکدیگر جمع شوند تا مقاومت نزدیک به مصون ایجاد گردد (Singh *et al.*, 2011). امروزه برای برخی از این ژن‌ها از جمله ژن‌های Yr36, Yr18, Yr36, Yr18 (Chen, 2005; Randhawa) YrA7 و Yrns-B1, Yr15, Yr5, (et al., 2012) Chen, 2005) مارکرهای مولکولی نیز پیدا شده و کار انتخاب را آسان‌تر کرده است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که لاین‌های تحت مطالعه واکنش‌های متنوعی نسبت به زنگ زرد نشان می‌دهند که از کاملاً مقاوم تا نیمه‌حساس متغیر است. اغلب لاین‌های ارزیابی‌شده تحت شرایط آلودگی بالا واکنش خوبی (نیمه‌مقاوم) نسبت به بیماری نشان دادند. در بین لاین‌های بررسی‌شده، تیپ‌های مقاومت از نوع مقاومت کامل و مقاومت نسبی مشاهده گردید. لاین‌های M-90-2, M-90-4, M-90-5, M-90-7, M-90-8, M-90-13 و M-90-17 بر اساس نتایج این تحقیق و اطلاعات شجره‌ای آنها به نظر می‌رسد از درجات متفاوتی از مقاومت نسبی (پایدار) نسبت به بیماری برخوردار باشند. در صورت جمع شدن ۴-۵ ژن مقاومت نسبی، مقاومت لاین‌ها نزدیک به مقاومت کامل یا مصون خواهد بود. در انتخاب نهایی لاین‌های مقاوم علاوه بر تأکید بر مقاومت پایدار نسبت به زنگ زرد، بهتر است مقاومت پایدار نسبت به زنگ قهوه‌ای و زنگ سیاه نیز مد نظر قرار گیرد تا ارقام از تولید پایداری برخوردار باشند.

سپاسگزاری

از آقای مهندس یوسف جهانی ریاست محترم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل و آقای جاوید محمدزاده و همه همکارانی که در اجرای این تحقیق ما را یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

مقاومت‌اند. در مقاومت HTAP بسته به دمای محیط، واکنش گیاه متفاوت است؛ به طوری که در بررسی شولتز و لاین (Shultz & Line, 1992) مشخص شده است که گیاهان بالغ نسبت به زنگ زرد در چرخه حرارتی روزانه ۱۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد مقاوم و در چرخه حرارتی روزانه ۲۱-۶ درجه سانتی‌گراد حساس‌اند. همچنین ارقام مختلف در درجات مختلف متفاوتی از مقاومت HTAP را نشان می‌دهند.

بروز حساسیت در تعداد زیادی از ارقام جدید و آن هم پس از مدت کوتاهی بعد از توسعه کشت، نشان‌دهنده وجود ژن‌های مقاومت اختصاص- نژادی در این ارقام است (Nazari *et al.*, 2000a). علاوه بر این تکیه بر مقاومت کامل و بدون هر گونه آلودگی، یا آلودگی کم و با تیپ آلودگی مقاوم (R) در انتخاب ارقام تأکیدی بر نحوه انتخاب ژن‌های مقاومت اختصاصی نسبت به نژاد بوده است. این موضوع به خوبی در شناسنامه معرفی بیشتر ارقام معرفی‌شده پس از همه‌گیری سال ۱۳۷۲ مشهود است (Nazari *et al.*, 2000a).

بنابراین تکیه بر مقاومت پایدار بایستی مهم‌ترین دغدغه به‌نژادگران باشد. زیرا ارقام دارای این مقاومت‌ها علی‌رغم تغییرات ویروالانس عامل بیماری چندین سال دوام آورده و پایدار مانده‌اند. برای مثال رقم Luke را می‌توان نام برد که از زمان معرفی آن در سال ۱۹۷۰ در آمریکا تا به حال مقاومت قابل قبولی در برابر زنگ زرد از خود نشان داده است و دلیل این امر مقاومت HTAP است (Chen, 2005). این نوع مقاومت که در مرحله گیاه کامل و در چرخه حرارتی ۳۰-۱۰ درجه سانتی‌گراد ظاهر می‌شود، از حالت پایداری برخوردار خواهد بود؛ به دلیل اینکه توسط چند ژن کنترل می‌شود و این ژن‌ها اثرهای جزئی دارند، اما به صورت افزایشی عمل می‌کنند (Millus & Line, 1986).

برای تولید ارقام مقاوم پایدار نسبت به زنگ زرد بهتر است در کنار استفاده از ژن‌های مقاومت مؤثر در مرحله گیاهچه‌ای از ژن‌های مقاومت غیراختصاص- نژادی (مقاومت گیاه کامل) نیز استفاده شود. از جمله ژن‌های مقاومت اختصاص- نژادی (گیاهچه‌ای) می‌توان به ژن‌های مقاومت Yr5 و Yr15 اشاره کرد که علاوه بر ایران (Safavi *et al.*, 2013)، تقریباً در همه نقاط جهان

REFERENCES

1. Afzal, S. N., Haque, M. I., Ahmedani, M. S., Bashir, S. & Rattu, A. R. (2007). Assessment of yield losses caused by *Puccinia striiformis* triggering stripe rust in the most common wheat varieties. *Pakistan Journal of Botany*, 39, 2127-2134.
2. Ali, S., Shah, S. J. A. & Ibrahim, M. (2007). Assessment of wheat breeding lines for slow yellow rusting (*Puccinia striiformis* West. *tritici*). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10, 3440-3444.
3. Ali, S., Shah, S. J. A. & Rahman, H. (2009a). Multi-location variability in Pakistan for partial resistance in wheat to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Phytopathologia Mediterranea*, 48, 269-278.
4. Ali, S., Shah, S. J. A., Khalil, I. H., Rahman, H., Maqbool, K. & Ullah, W. (2009b). Partial resistance to yellow rust in introduced winter wheat germplasm at the north of Pakistan. *Australian Journal of Crop Science*, 3, 37-43.
5. Badebo, A., Stubbs, R.W., Van Ginkel, M. & Gebeyehu, G. (1990). Identification of resistance genes to *Puccinia striiformis* in seedlings of Ethiopian and CIMMYT bread wheat varieties and lines. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 96, 199-210.
6. Bariana, H. S. & McIntosh, R. A. (1995). Genetics of adult plant resistance in four Australian and the French cultivar Hybrid de Bersee. *Plant Breeding*, 114, 485-491.
7. Ben Yehuda, P., Eilam, T., Manisterski, J., Shimoni, A. & Akster, Y. (2004). Leaf rust on *Aegilops speltoides* caused by a new forma specialis of *Puccinia triticina*. *Phytopathology*, 94, 94-101.
8. Boyd, L. A. (2005). Centenary review: can Robigus defeat an old enemy? -yellow rust of wheat. *Journal of Agricultural Science*, 143, 233-243.
9. Braun, H. I. & Saari, E. E. (1992). An assessment of the potential of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* to cause yield losses in wheat on the Anatolian plateau of Turkey. In: *Proceeding of the 8th European and Mediterranean Cereal Rusts and Powdery Mildews Conference*, 8-10 Sep., Wheihenstephen, Germany, pp.121-123.
10. Brennan, J. P. & Murray, G. M. (1988). Australian wheat diseases: Assessing their economic importance. *Agricultural Science New Series*, 1, 26-35.
11. Broers, L. H. M., Cuesta-Subias, X. & Lopez-Atilano, R. M. (1996) Field assessment of quantitative resistance to yellow rust in ten spring bread wheat cultivars. *Euphytica*, 90, 9-16.
12. Chen, X. M. (2005). Epidemiology and control of stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) on wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27, 314-337.
13. de Vallavieille-Pope, C., Ali, S., Leconte, M., Enjalbert, J., Delos, M. & Rouzet, J. (2012). Virulence dynamics and regional structuring of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in France between 1984 and 2009. *Plant Disease*, 96, 131-140.
14. Dehghani, H. & Moghaddam, M. (2004). Genetic analysis of latent period of stripe rust in wheat seedlings. *Journal of Phytopathology*, 122, 325-330.
15. El-Naimi, M., Yahyaoui, A., Ketata, H., Abdalah, O., Nachit, M. & Hakim, S. (2001). Screening for yellow rust resistance in bread and durum wheat. In: *Proceeding of the First Regional Yellow Rust Conference for Central & West Asia and North Africa*. 8-14 May, Karaj, Iran, p. 33.
16. Flor, H. H. (1956). The complementary genetic systems in flax and flax rust. *Advanced Genetics*, 8, 29-54.
17. Herrera-Fossel, S. A., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Crossa, J., Djurle, A. & Yuen, J. (2007). Evaluation of slow rusting resistance components to leaf rust in CIMMYT durum wheats. *Euphytica*, 155, 361-369.
18. Hovmoller, M. S. (2001). Disease severity and pathotype dynamics of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Denmark. *Plant Pathology*, 50, 181-189.
19. Jin, Y., Szabo, L. J. & Carson, M. (2010). Century-old mystery of *Puccinia striiformis* life history solved with the identification of *Berberis* as an alternate host. *Phytopathology*, 100, 432-435.
20. Jin, Y. (2011). Role of *Berberis* spp. as alternate hosts in generating new races of *Puccinia graminis* and *P. striiformis*. *Euphytica*, 179, 105-108.
21. Johnson, R. (1988). Durable resistance to yellow (stripe) rust in wheat and its implications in plant breeding. In: Simmonds N., W. & Rajaram, S. (eds.). *Breeding strategies for resistance to the rusts of wheat*, CIMMYT, Mexico, D. F. pp. 63-75.
22. Kilpatrick, R. A. (1975). New cultivars and longevity of rust resistance, 1971-1975. U.S Agricultural Research Service, ARS-NE 64, 20 pp.
23. Line, R. F. (2002). Stripe rust of wheat and barley in North America: A retrospective historical review. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 75-118.
24. Line, R. F. & Chen, X. M. (1995). Success in breeding for and managing durable resistance to wheat rusts. *Plant Disease*, 79, 1254-1255.
25. Mamluk, O. F. & EL-Naimi, M. (1992). Occurrence and virulence of wheat yellow rust in Syria. In: *Proceedings of the 8th European and Mediterranean Cereal Rusts and Powdery Mildews Conference*. 8-10 Sep., Wheihenstephen, Germany, pp.115-117

26. Mamluk, O. F., Haware, M. P., Makouk, K. M. & Hanounil. S. B. (1989). Occurrence, losses and control of important cereal and legume diseases in West and North Africa. In: *Proceedings of the 22nd International symposium Tropical Agriculture Research*, 25-27 Aug., Kyoto, Japan. pp. 131-140.
27. McIntosh, R. A., Wellings, C. R. & Park, R. F. (1995). *Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes*. CSIRO, Australia, 200 pp.
28. Line, R. & Qayoum, A. (1992). Virulence, aggressiveness, evolution, and distribution of races of *Puccinia striiformis* (the cause of stripe rust of wheat) in North America, 1968-87. *USDA-ARS Technical Bulletin*, 1788, 44 pp.
29. Milus, E. A. & Line, R. F. (1986). Gene action for inheritance of durable, high- temperature, adult plant resistances to stripe rust in wheat. *Phytopathology*, 76, 435-441.
30. Morgounov, A., Yessimbekova, M., Rsaliev, S., Baboev, S., Mumindjanov, H. & Djunusova, M. (2004). High-yielding winter wheat varieties resistant to yellow and leaf rust in Central and Asia. In: *Proceeding of the 11th International Cereal Rusts and Powdery Mildew Conference*, 22-27 Aug., Wageningen, Netherlands, p. 52.
31. Nazari, K., Torabi, M., Dehghan, M. A., Aghnom, R., Ahmadian-Moghaddam, M. S. & Fallah, H. (2000a). Pathogenicity of *Puccinia striiformis*, and reactions of improved cultivars and advanced lines of wheat to yellow rust in northern provinces of Iran. *Seed and Plant*, 16, 393-424. (In Farsi).
32. Nazari, K., Torabi, M., Hassanpour-Hosnei, M., Kashani, A., Hoshyar, R. & Ahmadian-Moghaddam, M. S. (2000b). Evaluation of resistance to yellow rust in advanced wheat lines suitable for dryland areas at seedling and adult-plant stages. *Seed and Plant*, 16, 252-262. (In Farsi).
33. Parlevliet, J. E. (1979). Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology*, 17, 203-222.
34. Pathan, A. K. & Park, R. F. (2006). Evaluation of seedling and adult plant resistance to leaf rust in European wheat cultivars. *Euphytica*, 149, 327-342.
35. Peterson, R. F., Campbell, A. B. & Hannah, A. E. (1948). A diagrammatic scale for estimating rust intensity of leaves and stems of cereals. *Canadian Journal of Research*, 26, 496-500.
36. Randhawa, H., Puchalski, B. J., Frick, M., Goyal, A., Despains, T., Graf, R. J., Laroche, A. & Gaudet, D. A. (2012). Stripe rust resistance among western Canadian spring wheat and triticale varieties. *Canadian Journal of Plant Science*, 92, 713-722.
37. Roelfs, A. P., Singh, R. P. & Saari, E. E. (1992). *Rust diseases of wheat: concepts and methods of diseases Management*. CIMMYT, Mexico, D. F. 81 pp.
38. Safavi, S. A., Afshari, F. & Yazdanehpas, A. (2013). Effective and ineffective resistance genes to wheat yellow rust during six years monitoring in Ardabil. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46, 774-780.
39. Safavi, S. A. & Afshari, F. (2012). Identification of resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in some elite wheat lines. *Journal of Crop Protection*, 1, 293-302.
40. Safavi, S. A., Ahari, A. B., Afshari, F. & Arzanlou, M. (2010). Slow Rusting Resistance in 19 promising wheat lines to yellow rust in Ardabil, Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13, 240-244.
41. Saidi, A., Nazari, K. & Torabi, M. (1998). Seedling resistance to yellow rust in current Iranian bread wheat In: *Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium*, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, pp. 308-310.
42. Sandoval-Islas, J. S., Broers, L. H. M., Mora-Aguilera, G., Parlevliet, J. E., Osada, K. S. & Vivar, H. E. (2007). Quatitative resistance and its components in 16 barley cultivars to yellow rust, *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*. *Euphytica*, 153, 295-308.
43. Schultz, T. R. & Line. R. F. (1992). High - temperature, adult plant resistances to wheat stripe rust and effects on yield components. *Agronomy Journal*, 84, 170-175.
44. Shah, S. J. A., Muhammad, M. & Hussain, S. (2010). Phenotypic and molecular characterization of wheat for slow rusting resistance against *Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *tritici*. *Journal of Phytopathology*, 158, 393-402.
45. Sharma-Poudyal, D., Chen, X. M., Wan, A. M., Zhan, G. M., Kang, Z. S., Cao, S. Q., Jin, S. L., Morgounov, A., Akin, B., Mert, Z., Shah, S. J. A., Bux, H., Ashraf, M., Sharma, R. C., Madariaga, R., Puri, K. D., Wellings, C., Xi K. Q., Wanyera, R., Manninger, K., Ganzález, M. I., Koyda, M., Sanin, S. & Patzek, L. J. (2013). Virulence characterization of international collections of the wheat stripe rust pathogen, *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Plant Disease*, 97, 379-386.
46. Singh, R. P. (1992). Association between gene *Lr34* for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in wheat. *Crop Science*, 32, 874-878.
47. Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Bhavani, S., Herrera-Foessel S. A., Singh D., Singh, P. K., Velu, G., Mason, R. E., Jin, Y., Njau, P. & Crossa, J. (2011). Race non-specific resistance to rust diseases in CIMMYT spring wheats. *Euphytica*, 179, 175-186.

48. Singh, R. P., Burnett, P. A., Albarran, M. & Rajaram S. (1993). *Bdv1*: a gene for tolerance to barley dwarf virus in bread wheat. *Crop Science*, 33, 231-234.
49. Singh, R. P., Huerta-Espino, J. & 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.
50. Singh, R. P., William, H. M., Huerta-Espino, J. & Crosby, M. (2003). Identification and mapping of gene *Yr31* for resistance to stripe rust in *Triticum aestivum* cultivar pastor. In: *Proceedings of the 10th International wheat genetics symposium*. Instituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Rome, Italy, pp. 411-413.
51. Stubbs, R. W., Prescott, J. M., Saari, E. E. & Dubin, H. J. (1986). *Cereal Disease Methodology Manual*. CIMMYT, Mexico, D. F. 46 pp.
52. Torabi, M., Madoukhi, V., Nazari, K., Afshari, F., Forootan, A. R., Ramai, M. A., Golzar, H. & 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.
53. Wan, A. M. & Chen, X. M. (2012). Virulence, frequency, and distribution of races of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* and *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* identified in the United States in 2008 and 2009. *Plant Disease*, 96, 67-74.