مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۲۹، شماره ۲، سال ۱۳۹۲

مقاله کوتاه علمی

Scientific Short Article

هرمی کردن ژن‌های مقاومت به بلاست *Pi*-1 و *Pi*-2 در برنج رقم طارم محلی

Pyramiding of Blast Resistance Genes *Pi*-1 and *Pi*-2 in Tarom Mahalli Rice Cultivar

صفرعلی مهدیان[۱] و عطاءالله شهسواری[۲]

۱ و ۲- به ترتیب استادیار و مربی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۴/۱۰ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۸/۱۸**

مهدیان، ص. ع. و شهسواری، ع. ۱۳۹۲. هرمی کردن ژن‌های مقاومت به بلاست *Pi*-1 و *Pi*-2 در برنج رقم طارم محلی. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۹:** ۳۹۵ - ۳۹۱.

بیماری بلاست برنج که به وسیله قارچ *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr (Anamorph: *Pyricularia oryzae*) به وجود می‌آید یکی از مهم‌ترین بیماری‌های برنج محسوب می‌شود. مبارزه شمیایی با این بیماری از معضلات مهم شالیکاران و محیط زیست است. کشاورزان تمایل زیادی به کاشت ارقام کیفی مانند طارم محلی دارند که از نظر عطر، طعم، پخت و بازارپسندی مطلوب ولی در مقابل بیماری بلاست خیلی حساس هستند. میزان دقیق خسارت بیماری بلاست برنج در ایران مشخص نیست امّا خسارت به اندازه‌ای است که مبارزه شیمیایی علیه آن هر سال انجام می‌شود و ده‌ها تن قارچکش برای مبارزه با این بیماری مصرف می‌شود. کنترل ژنتیکی و استفاده از رقم مقاوم به دلیل ارزان بودن و عدم ایجاد آلودگی در محیط زیست نسبت به سایر روش‌ها ارجحیت دارد. معمولاً ارقام زراعی برنج که فقط یک ژن مقاومت اصلی درمقابل بلاست دارند، بعد از چند سال مقاومت خود را از دست می‌دهند. بهترین راه به منظور تولید رقم مقاوم، هرمی کردن ژن‌های مقاومت است. انتقال وتلفیق توأم چند ژن مقاومت، موجب بروز طیف گسترده مقاومت در مقابل نژادهای مختلف بیماری می‌شود. پایداری این گونه مقاومت‌ها طولانی است و با تغییرات بیماریزایی قارچ عامل بیماری به راحتی شکسته نمی‌شود. در بین ژن‌های مقاومت اصلی، ترکیب ژن‌های *Pi*-1 و *Pi*-2 که به ترتیب به لاین‌های ایزوژن C101LAC و C101A51 انتقال داده شده‌اند، گسترده ترین طیف مقاومت در مقابل اغلب نژادهای *M. grisea* را به وجود آورده است

نویسنده مسئول: safaralim@gmail.com تلفن: ۰۱۵۱۳۸۲۲۵۶۳

Archive of SID

www.SID.ir

Chen *et al.*, 1995, 1996؛ Gnanamanickam *et al.*, 2000؛ Sivaraj *et al.*, 2000). به منظور هرمی کردن ژن‌های مقاومت به بلاست در هند، گنانامانیکام و همکاران (Gnanamanickam *et al.*, 2000) ابتدا در جمعیت عامل بیماری بلاست (*M. grisea*) تعداد ۲۹ لین ایج (Lineage) شناسایی کردند. تعیین لین ایج‌ها نشان داد که ترکیبی از ژن‌های *Pi*-1 و *Pi*-2 برای مقاومت به بلاست می‌تواند از بیماریزایی کلیه لین ایج‌ها ممانعت کند. بر این اساس در رقم Co39 که حساس به بلاست است هرم‌بندی *Pi*-1/*Pi*-2+*Pi*-1b بنا کردند. رقم Co39 هرم‌بندی شده به عنوان دهنده مقاومت جهت انتقال ژن‌های *Pi*-1+*Pi*-2 به ارقامی مانند جیوتی (Jyothi) و IR50 که ارقامی پر محصول امّا حساس به بلاست بودند نیز استفاده و در آزمایش‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای مقاومت آن‌ها ثابت شد. سیواراج و همکاران (Sivaraj *et al.*, 2000) نشان دادند که در هند جدایه‌هایی از قارچ *M. grisea* وجود دارد که روی ژن‌های *Pi*-1 و *Pi*-2 به تنهایی بیماریزا هستند امّا روی ترکیب این دو ژن هیچ جدایه‌ای بیماریزا نبود. گیریش کومار و همکاران (Girish Kumar *et al.*, 2000) به منظور انتقال ژن‌های مقاومت به سه رقم معمول برنج (IR36، IR64 و IR72)، لاین‌های ایزوژن حامل دو ژن مقاومت را با ارقام مورد آزمایش تلاقی دادند. چن و همکاران (Chen *et al.*, 1995, 1996) معتقدند ژن مقاومت *Pi*-2 در بین ژن‌های مقاومت به بلاست گسترده‌ترین طیف مقاومت را دارد و اگر با ژن *Pi*-1 ترکیب شود طیف مقاومت کاملی علیه اغلب نژادهای قارچ عامل بلاست به وجود می‌آورد.

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش شامل برنج رقم طارم محلی به عنوان والد مادری و لاین‌های ایزوژن C101LAC و C101A51 به ترتیب حامل ژن‌های مقاومت *Pi*-1 و *Pi*-2 به عنوان والد پدری از موسسه تحقیقات برنج کشور تهیه شد. بذر این گیاهان و دورگ‌های آن‌ها ابتدا در آزمایشگاه و سپس در خزانه و در مرحله ۳ تا ۴ برگی در زمین اصلی رشد داده شدند. تلاقی‌ها مطابق دیاگرام تهیه شده انجام شد. بدین منظور تک بوته‌های والد مادری در مرحله پیش از گرده‌افشانی اخته شدند یعنی یک سوّم انتهای هر یک از گلچه‌ها به صورت مورب قطع شد و پرچم‌ها به داخل ظرف ارلن‌مایر مکیده شدند. در والد پدری تعدادی خوشه در حال گرده‌دهی انتخاب و در اطاقک گرم و رطوبت بالا قرار داده شدند تا پرچم‌ها از داخل گل بیرون آمده و آماده گرده‌افشانی شدند. عمل گرده‌افشانی مصنوعی در اطاقک گرم و مرطوب و با تکاندن گرده‌های والد پدری روی والد مادری اخته شده انجام شد. نمونه‌های گرده‌افشانی شده با پاکت کاغذی پوشانده شدند و پس از گذشت ۱۵ الی ۲۵ روز برداشت شدند. گیاهان دو رگ شده ابتدا با استفاده از فنوتیپ ظاهری آن‌ها شناسایی شدند. صفات

Archive of SID

www.SID.ir

مورد نظر شامل لکه‌های کوچک میلی‌متری با حاشیه سبزردی یا لکه‌های میلی‌متری بدون حاشیه سبز بر روی برگ‌ها بود. ارتفاع بوته، تعداد پنجه، رنگ بوته و سایر مشخصات ظاهری بوته نیز برای کمک به تشخیص گیاهان مقاوم در نظر گرفته شد. برای تشخیص قطعی گیاهان هیبرید مقاوم، آزمون بیماریزایی در گلخانه با مایه‌زنی مخلوطی از اسپورهای جدایه‌های قارچ *M. grisea* از منطقه ساری انجام شد. ارزیابی عکس‌العمل گیاهان مایه‌زنی شده در گلخانه و در مزرعه با مقیاس ۰ تا ۵ و با استفاده از روش مکیل و بونمن (Mackill and Bonman, 1992) انجام شد. گیاهان مقاوم انتخاب شده به عنوان والد مادری استفاده شدند و با رقم طارم محلی به عنوان والد پدری تلاقی برگشتی داده شدند. انتخاب گیاهان مقاوم بعد از چهار مرحله تلاقی برگشتی مطابق روش ذکر شده انجام شد.

در نتیجه این پژوهش رقم ترمیم شده طارم محلی در مقابل جدایه‌های قارچ عامل بلاست در منطقه مقاومت نشان داد و بیانگر این بود که دو ژن مقاوم به بلاست برنج (*Pi*-2 و *Pi*-1) به رقم حساس طارم محلی منتقل شده‌اند. تیپ آلودگی ۴ و ۵ (حساسیت) آن که قبل از انجام پژوهش وجود داشت به تیپ آلودگی ۱ و ۲ (مقاومت) تبدیل شد. مورفولوژی گیاه و کیفیت آن تغییر جزیی کرد امّا جلوگیری از خسارت ناشی از بلاست رضایت‌بخش بود. مشاهده فنوتیپ گیاهان در مزرعه نشان داد که رنگ بوته‌های مقاوم تیره‌تر از بوته‌های حساس بوده و لکه‌های روی برگ کوچک و کمتر از یک میلی‌متر بودند. در آزمایش‌های بیماریزایی بوته‌های مقاوم تیپ آلودگی ۰ تا ۳ را گرفتند که نشان‌دهنده مقاومت آن‌ها بود، امّا والد مادری (طارم محلی) با درجه ۵ و در مقابل قارچ عامل بلاست حساسیت کامل داشت. برخی از هیبریدها تیپ‌های حساسیت نشان می‌دادند در نتیجه از بین گیاهان آزمایشی حذف شدند. به نظر می‌رسد این پدیده به علت عدم ثبات ژن(های) منتقل شده به آن‌ها بوده است.

لاین‌های ایزوژن C101LAC و C101A51 به ترتیب حامل ژن‌های غالب مقاومت به بلاست *Pi*-1 و *Pi*-2 (والد پدری) به عنوان رقم کیفی یا کمی کاشته نمی‌شوند. این لاین‌ها به عنوان دهنده مقاومت به بلاست در کشورهای مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند (Yu *et al.*, 1991؛ Hittalmani *et al.*, 1995, 1995a, 1995b؛ Gnanamanickam *et al.*, 2000؛ Chen *et al.*, 2000). دانه آن‌ها بسیار ریز و از نظر خوراکی کمترین کیفیت را دارد. در این پژوهش از لاین‌های فوق الذکر به عنوان والد پدری استفاده شد و سپس با تلاقی‌های برگشتی و انتخاب مورفولوژیکی و بیماریزایی گیاهانی انتخاب شدند که ضمن دارا بودن مقاومت، به خصوصیات والد مادری (طارم محلی) نزدیک‌تر بودند. رقم کیفی طارم محلی (والد مادری) در مقابل بیماری بلاست خیلی حساس است به طوری که در برخی از مراکز تحقیقاتی به عنوان

Archive of SID

www.SID.ir

اسپریدر در اطراف قطعات آزمایشی کاشته می‌شود امّا از نظر خوراکی کیفیت بالایی دارد، بذر آن درشت و عطر و طعم خوبی دارد. در این پژوهش با انباشته کردن (هرمی کردن) ژن‌های مقاومت به بلاست در رقم طارم محلی، طیف مقاومت بالایی حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: برنج، بیماری بلاست، ژن‌های مقاومت، انتقال ژن.

References

Chen, D. H., Nelson, R. J., Wang, G. L., Inukai, T., Mackill, D. J., and Ronald, P. C. 2000. Characterization of blast resistance in the durably resistant rice cultivar Moroberekan. pp. 17- 27. In: Tharreau, D., Lebbrun, M. H., Talbot, N. J., and Notteghem, J. L. (eds.) Advances in Rice Blast Research. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

Chen, D. H., Zeigler, R. S., Ahn, S. W., and Nelson, R. J. 1996. Phenotypic characterization of the rice blast resistance gene *Pi*- 2(t). Plant Disease 80: 52-56.

Chen, D. H., Zeigler, R. S., Leung, H., and Nelson, R. J. 1995. Population structure of *Pyricularia grisea* at two screening sites in the Philippines. Phytopathology 85: 1011- 1020.

Girish Kumar, K., Hittalmani, S., Srinivachary, P., and Shashidharhe, N. 2000. Marker assisted backcross gene introgression of major genes for blast resistance in rice. pp. 43- 53. In: Tharreau, D., Lebbrun, M. H., Talbot, N. J., and Notteghem, J. L. (eds.) Advances in Rice Blast Research. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

Gnanamanickam, S. S., Lavanya Babujee, Brindha Priyadarisini, V., Dayakar, B. V., Leenakumari, D., Sivaraj, R., Levy, M., and Leong, S. A. 2000. Lineage- exclusion resistance breeding: Pyramiding of blast resistance genes for management of rice blast in India. pp. 172-179. In: Tharreau, D., Lebbrun, M. H., Talbot, N. J., and Notteghem, J. L. (eds.) Advances in Rice Blast in Rice Blast Research. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

Archive of SID

www.SID.ir

Hittalmani, S., Foolad, M., Mew, T., Rodriguez, R. L., and Huang, N. 1995a. Identification of blast resistance gene *Pi*- 2(t) in rice plants by flanking DNA markers. Rice Gentetics Newsletter 11: 144- 146.

Hittalmani, S., Foolad, M., Mew, T., Rodriguez, R. L., and Huang, N. 1995b. Development of PCR based on markers to identify blast resistance gene *Pi*- 2(t) in a segregation population. Theoretical and Applied Genetics 91: 9-14.

Hittalmani, S., Mew, T., Khush, G. S., and Huang, N. 1995c. DNA marker assisted breeding for disease resistance in rice. In: Fragile Lives in Fragil Ecosystems. Proceedings of the International Rice Research Conference, 13- 17 Feb., International Rice Research Institute, Los Banos, Manila, Philippines.

Mackill, D. J., and Bonman, M. J. 1992. Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. Phytopathology 82: 746- 749.

Sivaraj, R., Gnanamanikam, S. S., and Levy, M. 2000. Lineage- exclusion tests for blast resistance in southern India. pp. 154- 161. In: Tharreau, D., Lebbrun, M. H., Talbot, N. J., and Notteghem, J. L. (eds.) Advances in Rice Blast Research. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

Yu, Z. H., Mackill, D. J., Bonman, J. M., and Tanksley, S. D. 1991. Tagging genes for blast resistance in rice via-linkage to RFLP markers, Theoretical and Applied Genetics 81: 471- 476.

Archive of SID

www.SID.ir