

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<sup>۱</sup> و عطاءالله شهسواری<sup>۲</sup>

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۸/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۴/۱۰

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

محیط زیست نسبت به سایر روش‌ها ارجحیت دارد. معمولاً ارقام زراعی برنج که فقط یک ژن مقاومت اصلی در مقابل 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 و تلفیق 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، گسترده‌ترین طیف مقاومت در مقابل اغلب نژادهای *M. grisea* را به وجود آورده است

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 شیمیایی 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 اما 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

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 سوم 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 رنگ شده ابتدا با استفاده از فنوتیپ ظاهری آن‌ها شناسایی شدند. صفات

(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 لاین ایج (Lineage) شناسایی کردند. تعیین لاین ایج‌ها نشان داد که ترکیبی از ژن‌های  $Pi-1$  و  $Pi-2$  برای مقاومت به بلاست می‌تواند از بیماریزایی کلیه لاین ایج‌ها ممانعت کند. بر این اساس در رقم Co39 که حساس به بلاست است هرم‌بندی  $Pi-1/Pi-$   $1b+Pi-2$  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 اما 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 اما 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)

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، اما 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 C101A51 و C101LAC با 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 فوق‌الذکر 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

مورد نظر شامل لکه‌های کوچک میلی‌متری با حاشیه سبزدی 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-1* و *Pi-2*) 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 جزئی کرد اما جلوگیری از خسارت ناشی از بلاست رضایت‌بخش بود. مشاهده فنوتیپ گیاهان در مزرعه نشان داد که رنگ

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

**واژه های کلیدی:** برنج، بیماری بلاست، ژن های 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., Lebrun, M. H., Talbot, N. J., and Nottoghem, 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., Lebrun, M. H., Talbot, N. J., and Nottoghem, 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., Lebrun, M. H., Talbot, N. J., and Nottoghem, J. L. (eds.) *Advances in Rice Blast in Rice Blast Research*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

- 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 Genetics 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 Fragile 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., Lebrun, 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.

