شناسایی ژن‌های مقاومت به بیماری بلاست برنج در ژنوتیپ‌های شمال ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی

Identification of the blast-resistant genes in the rice genotypes in northern Iran using molecular markers

مریم فریفته[۱]، بهار مرید[۲*] و حمیدرضا زمانی زاده[۳]

دریافت: ۱۴۰۲/۲/۱۲ پذیرش: ۱۴۰۲/۴/۲۰

چکیده

بیماری بلاست برنج حاصل از قارچ *Magnaporthe grisea*، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عامل کاهش بهره‌وری کشت برنج است. استفاده از ارقام مقاوم حامل ژن‌های اصلی مقاومت، به‌عنوان یکی از بهترین روش‌های قابل اطمینان جهت کنترل این بیماری است. به همین منظور، برای شناسایی ارقام و لاین‌های برنج مقاوم به بلاست، از تعدادی آغازگر همبسته با ژن‌های مقاومت *Pia*، *Pib* و *Pi5* (آغازگرهای Yca72، Nsb و JJ817) استفاده شد. استخراج DNA از برگ گیاهچه‌های ده روزه ارقام برنج مورد آزمایش، به روش CTAB انجام شد. سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و الکتروفورز نوارهای تکثیر شده محصول PCR انجام گردید. استفاده از آنزیم Hinf I، جهت هضم آنزیمی فرآورده‌های PCR با بکارگیری آغازگر Yca72، نشان داد که دو رقم قائم و گیلانه دارای ژن مقاومت *Pia* بوده و احتمالاً در مقابل بیماری بلاست برنج مقاوم هستند. نتایج در رابطه با آغازگر Nsb نشان داد که تمام ارقام برنج مورد بررسی به جز رقم ساحل، دارای ژن مقاومت *Pib* بوده و بنابراین می‌توانند نسبت به بیماری بلاست برنج، مقاوم در نظر گرفته شوند. انجام PCR با آغازگر JJ817، نشان داد که تمام ارقام برنج مورد بررسی به جز ارقام سپید رود و ساحل دارای ژن مقاومت *Pi5* بوده و احتمالاً نسبت به بیماری بلاست برنج مقاوم هستند. همچنین رقم‌های برنج قائم و گیلانه با داشتن هر سه ژن مقاومت *Pia*، *Pib* و *Pi5* جزء ارقام مقاوم و رقم ساحل به دلیل فقدان هر سه ژن مقاومت مورد بررسی، حساس‌ترین رقم شناخته شدند. رقم ساحل نسبت به ارقام دارای ژن مقاوم حساس‌تر شناخته شد و همین امر منجر به بروز بیماری در این رقم می‌گردد.

واژگان کلیدی: بیماری بلاست برنج، ژن‌های مقاومت، *Pia*، *Pib*، *Pi5*

مقدمه

بلاست با عامل *Magnaporthe grisea*؛ بیمارگر قارچی به نام *Pyricularia oryzae Cavara* یکی از بیماری‌های مهم برنج است که بر عملکرد و کیفیت بذر اثر می‌گذارد و موجب کاهش عملکرد محصول برنج به‌ویژه در مناطق مرطوب می‌شود. سوختگی غلاف ناشی از این قارچ، از مهمترین بیماری‌های قارچی تحت شرایط کشت آبی به شمار می‌رود. عدم دسترسی خوشه‌ها در بوته‌های آلوده به آب و مواد غذایی کافی، سبب باریک شدن دانه‌ها و عدم تشکیل خوشه می‌گردد؛ در نهایت دانه‌های لاغر ضمن آسیاب کردن خرد می‌شوند. همچنین ممکن است بوته‌ها در اثر ابتلا به این بیماری ورس کنند که این امر به کاهش میزان و مرغوبیت محصول منجر شده و از لحاظ اقتصادی خسارت زیادی به بار می‌آورد (Cho *et al*., 2003).

بررسی‌های آماری نشان می‌دهد که سه استان شمالی کشور، گیلان، مازندران و گلستان به علت شرایط ویژه آب و

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تاکستان، قزوین، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: bahar_iris@yahoo.com

هوایی، کشت ارقام پر محصول و مصـرف زیاد کود ازتـه دارای بیشـترین میزان آلودگی به بیماری بلاست هستند (مرادی و همکاران، ۱۳۸۸). با هدف مقاوم‌سازی ارقام برنج نسبت به این بیماری، پروژه‌های انتقال ژن به ارقام برنج و معرفی ارقام مناسب انجام شده است (مرادی و همکاران، ۱۳۸۸)، تا در نهایت بتوان به جای استفاده بی‌رویه از قارچ‌کش‌ها، ارقامی با حساسیت کمتر به این بیماری را معرفی نمود. با اطلاع از نحوه پراکنش این قارچ در استان‌های مختلف می‌توان به کشاورزان توصیه کرد که از گیاهان غیرمیزبان بیمارگر در تناوب کشت استفاده کنند تا از تراکم عامل بیماری و در نهایت کاهش محصول جلوگیری شود. بکارگیری ارقام مقاوم، مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین روش کنترل این بیماری است. مقاوم کردن ارقام زراعی مزایای زیادی در مقایسه با بکارگیری ترکیبات شیمیایی و سایر روش‌های مبارزه دارد که عبارتند از کاهش هزینه سموم، تقلیل در نیروی کار و کاهش زمان. شناسایی ژن‌های مقاومت در ارقام برنج مهم‌ترین گام به منظور دستیابی به ارقام تجاری مقاوم به این بیماری است. روش‌های کلاسیک، نیازمند ارزیابی تعداد زیادی ژنوتیپ است؛ گرچه این نوع ارزیابی‌های فنوتیپی برای مقاومت به بیمارگر، مشکل و پر هزینه بوده و تحت تأثیر عوامل محیطی قرار دارد (Singh *et al*., 2015). در سال‌های اخیر نشانگرهای مولکولی به‌عنوان ابزارهایی کارآمد و به‌عنوان مکمل روش‌های کلاسیک برای مکان‌یابی و شناسایی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی و برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر به کار می‌رود (مـرادی و همـکاران، ۱۳۸۸). پیشرفت‌های اخیـر در زمیـنه ژنومیـکـس برنـج محقـقین را قـادر به اسـتفاده از نـشـانـگرهای DNA بـه منـظور اصـلاح ارقـام مقـاوم از طـریق انتخـاب به کمک نشـانگر (MAS) کرده است (Singh *et al*., 2015). در روش‌های انتخاب بر مبنای نشانگر (MAS)، همبستگی بین نشانگرهای DNA و صفات مهم زراعی مانند مقاومت به بیماری‌ها تعیین می‌شود و نشانگرهایـی که در مجـاورت ژن هـدف قرار دارند، شناسایی و انتـخاب می‌شـوند. مـزیـت این کار شـنـاسـایی گیـاهان حـامل ژن‌هـای هـدف به‌طور همـزمان و بدون قرار دادن در معرض هجوم بیمارگر است (Singh *et al*., 2015).

تحقیق حاضر یک پژوهش توصیفی-کاربردی بر مبنای گردآوری داده‌ها از طریق مشاهده و آزمون است. هدف از انجام این تحقیق استفاده از نشانگرهای مولکولی برای مطالعه حساسیت و مقاومت ژنوتیپ‌های برنج نسبت به بیماری بلاست است.

مواد و روش‌ها

بذور مورد استفاده

جامعه آماری مورد استفاده در این آزمایش، شامل ۱۴ لاین و رقم برنج بودند که از مؤسسه تحقیقات برنج کشور تهیه گردید (جدول ۱). اطلاعاتی در خصوص حساس یا مقاوم بودن این ۱۴ رقم از قبل وجود نداشت.

آماده‌سازی بذرها و استخراج DNA

ابتدا بذرهای برنج مورد استفاده ضدعفونی گردیدند. به این منظور در ابتدا بذرهای معیوب و پوک که روی آب مقطر استریل شناور ماندند، حذف شدند. بذرهای به ظاهر سالم، جهت تحریک به رشد احتمالی قارچ‌های موجود و همچنین تأمین قسمتی از آب مورد نیاز برای جوانه‌زنی، به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر سترون قرار گرفتند و پس از جذب آب لازم، جهت ضدعفونی به‌مدت ۲۴ ساعت در محلول ۲ در هزار بنومیل قرار داده شدند. بذور ضدعفونی شده داخل تشتک‌های سترون حاوی کاغذ صافی مرطوب و سپس داخل انکوباتور در درجه حرارت ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از گذشت ۵ روز بذرهایی که جوانه زده بودند در زیر هود لامینار فلو به تشتک‌های سترون دیگری حاوی کاغذ صافی مرطوب منتقل شدند. جهت وجـود فضـای کافـی بـرای رشـد بذر، داخـل هـر پتری فقط یک عدد بذر جوانه زده، گذاشتـه شد. تشتک‌ها به ژرمـیـنـاتور با دمـای ۳۰ درجـه سلسـیـوس و رطـوبت نسـبی ۷۵٪ منتقـل شدنـد. پـس از گذشـت ۱۰ روز، از بـرگ گیاهچه‌ها، جـهـت استـخراج دی‌ان‌ای استفـاده گردید. جهـت استخراج DNA از روش CTAB استفاده شد (Jennings *et al*., 2003).

جدول ۱- مشخصات ارقام و لاین‌های برنج مورد استفاده

Table 1. Properties of the used rice cultivars and lines

No. شماره	نام رقم یا لاین	Variety or Line
1	بینام	Binam
2	سپیدرود	Sepidrood
3	مولایی	Molaei
4	درفک	Dorfak
5	سالاری	Salari
6	صالح	Saleh
7	گرم طارم	Garme Tarom
8	گیل ۱	Gil 1
9	گیل ۳	Gil 3
10	ندا	Neda
11	ساحل	Sahel
12	قائم	Ghaem
13	گیلانه	Gilaneh
14	دم سرخ	Dom Sorkh

کمیت سنجی دی‌ان‌ای استخراجی

جهت بررسی کمیت DNA استخراجی و همچنین میزان خلوص آن از روش الکتروفورز با ژل اگارز ۱٪ استفاده گردید. به این نحو که ۰/۳ گرم پودر آگارز به ۳۰ میلی‌لیتر TBE بافر 1X درون ارلن افزوده و هم زده شد تا آگارز کاملاً داخل بافر مخلوط گردد. سپس مخلوط حاصل سه بار و هر بار به مدت ۱۵ ثانیه داخل مایکروویو قرار گرفت تا یک محلول شفاف به‌دست آمد. پس از ۳ الی ۵ دقیقه انتظار برای کاهش دمای محلول، ۰/۳ میکرولیتر اتیدیوم بروماید به آن اضافه شد و سپس به داخل تشتک الکتروفورز که قبلاً شانه‌گذاری شده بود، ریخته شد. پس از جامد شدن آگارز، شانه از داخل ژل خارج گشته و تشتک حاوی ژل درون بافر مخزن الکترفورز قرار گرفت. یک تکه پارافیلم آماده شد و روی آن به ازای هر نمونه، ۱ میکرولیتر loading بافر قرار داده شد. سپس ۳ میکرولیتر از محلول DNA از درون تیوب برداشته و با loading بافر به خوبی مخلوط شد. سپس مخلوط حاصل درون چاهک‌های ژل قرار گرفته و ولتاژ دستگاه روی ۸۰ ولت تنظیم و اجازه داده شد تا نمونه‌ها روی ژل حرکت کنند. پس از طی مدت زمان ۳۰ الی ۴۵ دقیقه ولتاژ قطع و در زیر نور UV دستگاه ژل‌داک، DNA استخراجی بررسی شد.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

در این مرحله از آزمایش از آغازگرهای Yca72، Nsb و JJ817 استفاده شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ ارائه شده است (Cho *et al*., 2007). آغازگر Yca72 یک آغازگر اختصاصی است که جهت تکثیر یک قطعه ۹۰۵ جفت بازی توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد استفاده قرار گرفت. این آغازگر بر اساس توالی‌های ژنومی کلون BAC OSJNBa44D15 روی کروموزوم شماره ۱۱ طراحی شده است. چنانچه فرآورده واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز این آغازگر توسط آنزیم برشی Hinf I برش داده شده و ایجاد یک باند ۶۳۵ جفت بازی نماید، نشان‌دهنده آن است که رقم مورد نظر دارای ژن مقاومت *Pia* بوده است (Cho *et al*., 2007).

آغازگر Nsb یک آغازگر اختصاصی است که جهت تکثیر یک قطعه ۶۲۹ جفت بازی توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد استفاده قرار گرفت. این آغازگر بر اساس توالی‌های ژنومی ژن‌های مقاومت به بیماری بلاست روی کروموزوم شماره ۲ طراحی شده است. چنانچه این آغازگر در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بتواند یک قطعه ۶۲۹ جفت بازی را تکثیر نماید، نشان‌دهنده آن است که رقم مورد نظر دارای ژن مقاومت *Pib* بوده است (Jeon *et al*., 2003 ؛Yi *et al*., 2004).

آغازگر JJ817 یک آغازگر اختصاصی است که جهت تکثیر یک قطعه ۱۴۵۰ جفت بازی توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد استفاده قرار گرفت. ایـن آغـازگر بر اساس توالی‌هـای ژنومی ژن‌های مقاومت به بیماری بلاست روی کروموزوم شماره ۹ طراحی شده است. چنانچه این آغازگر در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بتواند یک قطعه ۶۲۹ جفت بازی را تکثیر نماید، نشان‌دهنده آن است که رقم مورد نظر دارای ژن مقاومت *Pi5* بوده است (Jeon *et al*., 2003).

جدول ۲- آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت شناسایی ارقام مقاوم به بیماری بلاست برنج
Table 2. Primers used in polymerase chain reaction to identify cultivars resistant against blast

آغازگر Primer	ژن مقاومت Resistance gene	شماره کروموزوم Chromosome No.	توالی Forward (3'-5') Forward sequence (5'-3')	توالی Reverse (3'-5') Reverse sequence (3'-5')	دمای اتصال (°C) Tm (°C)	باند تکثیر شده (جفت بازی) Amplified DNA band (bp)
Yca7	*Pia*	11	AGGAGAAGAAGCCACCAAGG	GAGCTGCCACATCTTCCTT	60	905
Nsb	*Pib*	2	ATCAACTCTGCCACAAAATCC	CCCATATCACCACTTGTTCCCC	57	629
JJ817	*Pi5*	9	GATATGGTTGAAAAGCTAATCTCA	ATCATTGTCCTTCATATTCAGAGT	60	1450

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر انجام گردید و مخلوط تهیه شده داخل دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. برنامه دمایی مورد استفاده برای هر سه پرایمر و ژن عبارت بودند از: واسرشتگی مقدماتی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سلسیوس، ۳۰ چرخه دمایی شامل ۴۰ ثانیه دمای ۹۶ درجه سلسیوس؛ ۴۰ ثانیه دمای لازم جهت اتصال آغازگرهای متفاوت و به شرح جدول ۴ و ۹۰ ثانیه دمای ۷۲ درجـه سلسـیوس؛ گسـترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام پذیرفت (Cho *et al*., 2007).

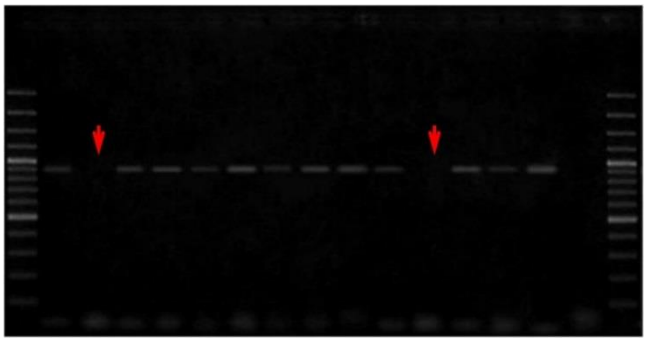
میزان مقاومت و یا حساسیت ارقام برنج مورد بررسی بر اساس وجود یا عدم وجود باندهای اختصاصی تکثیر شده توسط هر آغازگر در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد بررسی قرار گرفت.

الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شدند. ۹ میکرولیتر از محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با یک میکرولیتر loading بافر مخلوط گردید و داخل چاهک‌های ژل ریخته شد. نردبان ژنتیکی مورد استفاده برای تعیین اندازه باندهای تکثیری، 100bp ساخت شرکت Fermentas با شماره کاتالوگ SM0323 بود. ولتاژ دستگاه روی ۸۰ ولت تنظیم شد. پس از حرکت محصولات روی ژل به بررسی باندهای تکثیر شده در زیر نورUV دستگاه ژل داک پرداخته شد.

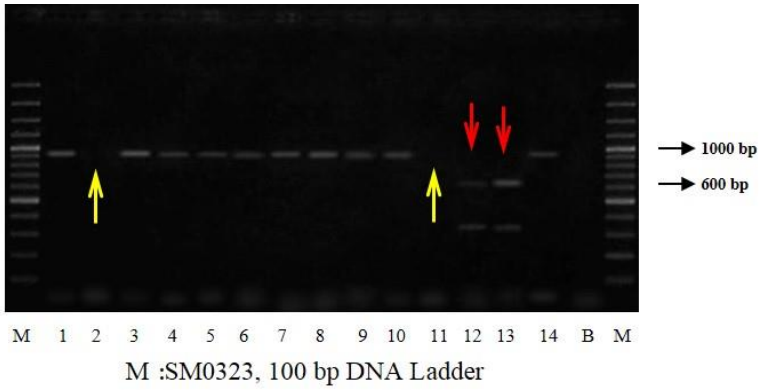
نتایج

نمونه‌های دی‌ان‌ای استخراج شده از برگ گیاهچه‌های برنج از خلوص و غلظت مناسبی برخوردار بودند. انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگر YCA72 در اکثر ارقام برنج مورد بررسی به جز ارقام سپیدرود و ساحل (چاهک‌های شماره ۲ و ۱۱) یک باند ۹۰۵ جفت بازی ایجاد نمود (شکل ۱ و جدول ۳). هضم آنزیمی فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز این آغازگر با استفاده از آنزیم Hinf I در اکثر ژنوتیپ‌های مورد بررسی نتوانست سبب هضم آنزیمی شود و فقط در مورد رقم‌های قائم و گیلانه (چاهک‌های شماره ۱۲ و ۱۳)، هضم آنزیمی سبب تولید یک باند ۶۳۵ جفت بازی گردید (شکل ۲ و جدول ۳). بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که دو رقم قائم و گیلانه دارای ژن مقاومت *Pia* بوده و احتمالاً به بیماری بلاست برنج مقاوم می‌باشند.



شکل ۱- الگوی باند آغازگر YCA72 در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه

Fig. 1. Band pattern of YCA72 primer in studied rice genotypes



شکل ۲- الگوهای باند حاصل از هضم آنزیمی فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آغازگر YCA72 ژنوتیپ‌های برنج با به‌کارگیری آنزیم Hinf I

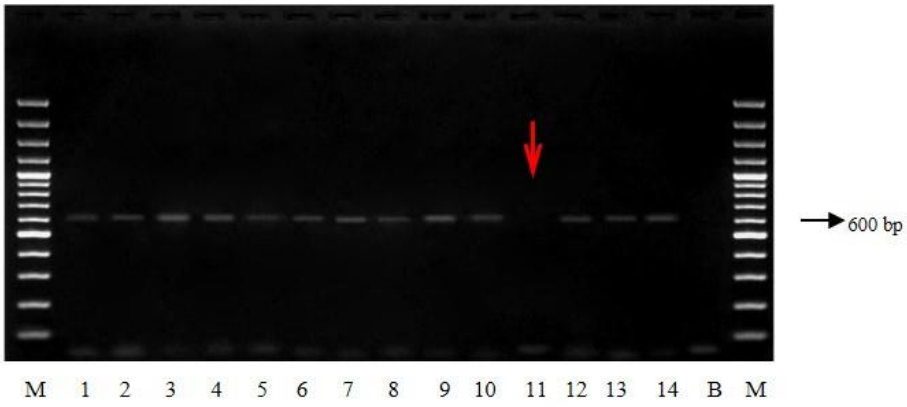
Fig. 2. Band pattern of enzymatic digestion of the products of polymerase reaction of YCA72 primer in rice genotypes using Hinf I enzyme

جدول ۳- مقاومت و حساسیت ارقام برنج مورد بررسی با به‌کارگیری آغازگر YCA72 و برش آنزیمی توسط آنزیم Hinf I

Table 3. Resistance and sensitivity of cultivars using YCA72 primer and enzymatic incision by Hinf I enzyme

ردیف Index	نام رقم	Variety	باند ۹۰۵ جفت بازی 905bp	باند ۶۳۵ جفت بازی ناشی از برش آنزیم HinfI 635 bp band resulting from HinfI restriction enzyme	مقاوم/حساس	Resistance/ Sensitive
1	بینام	Binam	+	–	حساس	Sensitive
2	سپیدرود	Sepidrood	–	–	حساس	Sensitive
3	مولایی	Molaee	+	–	حساس	Sensitive
4	درفک	Dorfak	+	–	حساس	Sensitive
5	سالاری	Salari	+	–	حساس	Sensitive
6	صالح	Saleh	+	–	حساس	Sensitive
7	گرم طارم	Garme Tarom	+	–	حساس	Sensitive
8	گیل ۱	Gil 1	+	–	حساس	Sensitive
9	گیل ۳	Gil 3	+	–	حساس	Sensitive
10	ندا	Neda	+	–	حساس	Sensitive
11	ساحل	Sahel	–	–	حساس	Sensitive
12	قائم	Ghaem	+	+	مقاوم	Resistance
13	گیلانه	Gilaneh	+	+	مقاوم	Resistance
14	دم سرخ	Dom Sorkh	+	–	حساس	Sensitive

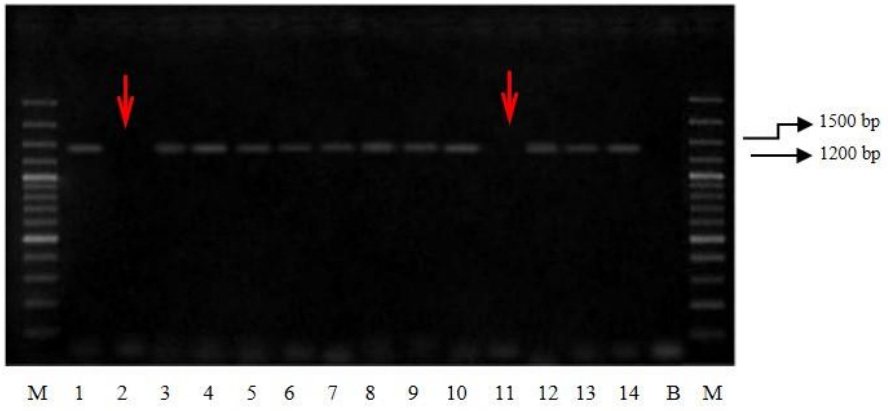
انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگر Nsb در اکثر ارقام برنج مورد بررسی تولید یک باند ۶۲۹ جفت بازی نمود. فقط در مورد رقم ساحل (چاهک شماره ۱۱) هیچ باندی تولید نشد (شکل ۳). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اکثر ارقام برنج مورد بررسی به جز رقم ساحل دارای ژن مقاومت *Pib* بوده و لذا می‌توان آنها را نسبت به بیماری بلاست برنج مقاوم در نظر گرفت (جدول ۴).



شکل ۳- الگوهای باند آغازگر Nsb در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه

Fig. 3. Band patterns of Nsb primer in studied rice genotypes

انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگر jj817 در اکثر ارقام برنج مورد بررسی تولید یک باند ۱۴۵۰ جفت بازی نمود. فقط در مورد ارقام سپیدرود و ساحل (چاهک‌های شماره ۲ و ۱۱) هیچ باندی تولید نشد (شکل ۴). بنابراین چنین نتیجه‌گیری می‌شود که ارقام سپیدرود و ساحل فاقد ژن مقاومت *Pi5* بودند و احتمالاً نسبت به بیماری بلاست برنج حساس باشند (جدول ۵).



شکل ۴- الگوهای باند آغازگر jj817 در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه

Fig. 4. Band patterns of jj817 primer in studied rice genotypes

نتایج حاصل از به‌کارگیری هر سه آغازگر و تعداد ژن‌های مقاومت تکثیر شده توسط آن‌ها، مربوط به هر رقم برنج مورد آزمایش در جدول ۶ نشان داده شده است. به‌عنوان یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که ارقام قائم و گیلانه با دارا بودن هر سه ژن مقاومت مورد بررسی به‌عنوان مقاوم‌ترین ارقام و رقم ساحل با نداشتن هیچ ژن مقاومت به‌عنوان حساس‌ترین رقم به بیماری بلاست برنج شناخته می‌شود.

جدول ۴- مقاومت و حساسیت ارقام برنج مورد بررسی با به‌کارگیری آغازگر Nsb

Table 4. Resistance and sensitivity of cultivars using Nsb primer

ردیف Index	نام رقم	Variety	باند ۶۲۹ جفت بازی 629 bp	مقاوم/حساس	Resistance/ Sensitive
1	بینام	Binam	+	مقاوم	Resistance
2	سپیدرود	Sepidrood	+	مقاوم	Resistance
3	مولایی	Molaee	+	مقاوم	Resistance
4	درفک	Dorfak	+	مقاوم	Resistance
5	سالاری	Salari	+	مقاوم	Resistance
6	صالح	Saleh	+	مقاوم	Resistance
7	گرم طارم	Garme Tarom	+	مقاوم	Resistance
8	گیل ۱	Gil 1	+	مقاوم	Resistance
9	گیل ۳	Gil 3	+	مقاوم	Resistance
10	ندا	Neda	+	مقاوم	Resistance
11	ساحل	Sahel	–	حساس	Sensitive
12	قائم	Ghaem	+	مقاوم	Resistance
13	گیلانه	Gilaneh	+	مقاوم	Resistance
14	دم سرخ	Dom Sorkh	+	مقاوم	Resistance

جدول ۵- مقاومت و حساسیت ارقام برنج مورد بررسی با به‌کارگیری آغازگر jj817

Table 5. Resistance and sensitivity of cultivars using jj817 primer

ردیف Index	نام رقم	Variety	باند ۶۲۹ جفت بازی 629bp	مقاوم/حساس	Resistance/ Sensitive
1	بینام	Binam	+	مقاوم	Resistance
2	سپیدرود	Sepidrood	–	حساس	Sensitive
3	مولایی	Molaee	+	مقاوم	Resistance
4	درفک	Dorfak	+	مقاوم	Resistance
5	سالاری	Salari	+	مقاوم	Resistance
6	صالح	Saleh	+	مقاوم	Resistance
7	گرم طارم	Garme Tarom	+	مقاوم	Resistance
8	گیل ۱	Gil 1	+	مقاوم	Resistance
9	گیل ۳	Gil 3	+	مقاوم	Resistance
10	ندا	Neda	+	مقاوم	Resistance
11	ساحل	Sahel	–	حساس	Sensitive
12	قائم	Ghaem	+	مقاوم	Resistance
13	گیلانه	Gilaneh	+	مقاوم	Resistance
14	دم سرخ	Dom Sorkh	+	مقاوم	Resistance

بحث و نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر نتایج حاصل از استفاده ار آغازگرهای اختصاصی yca72، Nsb و jj817 نشـان داد که بـرخی از ارقام برنج مـورد بررسـی دارای ژن‌های مقاومـت بودنـد. به نحـوی که فقـط رقم‌های برنج قائـم و گیلانه دارای ژن مقاومت *Pia* بودند. همچنین همه ارقام مورد بررسی دارای ژن‌های مقاومت *Pib* و *Pi5* بودند. در این رابطه فقط دو استثناء وجود داشت؛ رقم ساحل فاقد ژن‌های مقاومت *Pib* و *Pi5* و رقم سپیدرود فاقد ژن مقاومت *Pi5* بودند. بنابر نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان چنین گفت که رقم‌های برنج قائم و گیلانه با داشتن هر سه ژن مقاومت *Pia*، *Pib* و *Pi5*

به نظر مقاوم‌ترین رقم‌های برنج به قارچ عامل بیماری بلاست برنج هستند و رقم ساحل به دلیل فقدان هر سه ژن مقاومت مورد بررسی به عنوان حساس‌ترین رقم شناسایی شد.

جدول ۶- ژن‌های مقاومت تکثیر شده با استفاده از سه آغازگر در ارقام مختلف برنج مورد مطالعه

Table 6. Replicated resistant genes using three primers in studied rice cultivars

ردیف Index	نام رقم	Variety	ژن مقاومت *Pia* *Pia* resistant gene	ژن مقاومت *Pib* *Pib* resistant gene	ژن مقاومت *Pi5* *Pi5* resistant gene	مجموع تعداد ژن‌های مقاومت Total number of resistant genes
1	بینام	Binam	–	+	+	2
2	سپیدرود	Sepidrood	–	+	–	1
3	مولایی	Molaee	–	+	+	2
4	درفک	Dorfak	–	+	+	2
5	سالاری	Salari	–	+	+	2
6	صالح	Saleh	–	+	+	2
7	گرم طارم	Garme Tarom	–	+	+	2
8	گیل ۱	Gil 1	–	+	+	2
9	گیل ۳	Gil 3	–	+	+	2
10	ندا	Neda	–	+	+	2
11	ساحل	Sahel	–	–	–	0
12	قائم	Ghaem	+	+	+	3
13	گیلانه	Gilaneh	+	+	+	3
14	دم سرخ	Dom Sorkh	–	+	+	2

(+) : وجود ژن مقاومت (-) : عدم وجود ژن مقاومت

(+): Presence of resistant gene, (-): Absence of resistant gene

همچنین رقم سپیدرود فاقد ژن‌های مقاومت *Pia* و*Pi5* بود و بنابراین می‌تواند رقمی حساس محسوب شود. هر چند که نتایج تحقیقات موسی‌نژاد و همکاران (۱۳۸۹) و مؤمنی و همکاران (۱۳۸۵) این رقم را جزء ارقام مقاوم گزارش نمودند. شاید علت این اختلاف در نتایج، ظهور نژادهای جدیدی از عامل بیماری باشد. در تحقیقی رقم ساحل را به‌عنوان رقمی مقاوم به بیماری بلاست برنج تحت شرایط گلخانه‌ای گزارش نمودند (مؤمنی و همکاران، ۱۳۸۵). در حالی‌که زربافی و همکاران (۱۳۹۸)، در تحقیقات خود رقم ساحل را رقمی نسبتاً حساس به بیماری بلاست برنج تحت شرایط خزانه گزارش نمودند که با نتایج حاصل از این تحقیق مشابه است؛ اگرچه رقم قائم در تحقیق آن‌ها در مقابل بلاست، نسبتاً حساس معرفی شد.

در تحقیق حاضر رقم‌های سپیدرود و گیل ۱ به‌عنوان ارقامی با ژن‌های مقاومت شناسایی شدند. در حالی‌که برخی از محققین، ارقام سپید رود و گیل ۱ را به عنوان ارقامی نسبتاً حساس گزارش کرده‌اند که هم راستا با نتایج این تحقیق نیست (موسی نژاد، ۱۳۸۹) زربافی و همکاران، ۱۳۹۸). همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که رقم ندا رقمی دارای ژن‌های مقاومت است که هم‌راستا با نتایج تحقیقات زربافی و همکاران (۱۳۹۸) بود. علاوه بر نتایج حاصل از این تحقیق، ژنوتیپ‌های اصلاح شده ایرانی ندا و خزر در مقالات و گزارش‌های متعددی به‌عنوان ژنوتیپ‌های مقاوم به بلاست معرفی شده‌اند (مؤمنی و همکاران، ۱۳۸۵). ظاهراً مقاومت مشاهده شده در این ارقام به دلیل هرمی شدن ژن‌های مقاومت احتمالی باشد که طی مراحل اصلاحی رخ داده است. عابدی و همکاران، نیز بیان کردند که واکنش مقاومت مشاهده شده تحت دو شرایط خزانه و گلخانه در رقم ندا، می‌تواند نشان‌دهنده وجود ژن‌های مناسب جهت مقاومت به بیماری بلاست باشد که با نتایج این تحقیق در یک راستا بود (عابدی و همکاران، ۱۳۹۰).

هر چند در این تحقیق با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، ارقام دارای ژن‌های مقاومت به بیماری بلاست شناسایی شدند؛ اما به نظر می‌رسد که با توجه به توانایی برخی از نژادهای قارچ *M. gresea* در شکستن سد ژنه‌ای مقاومت،

می‌بایست تحقیقاتی در رابطه با واکنش این ارقام به نژادهای مختلف قارچ عامل بیماری بلاست هم در شرایط گلخانه‌ای و هم تحت شرایط مزرعه‌ای انجام گیرد.

منابع References

حسینی ایمنی، ص. ۱۳۸۲. بررسی اثر تاریخ نشاکاری، فواصل بوته و کود ازته بر شاخص های رشد، عملکرد و اجزاء عملکرد لاین جدید برنج ۸۰۰۸. پایان نامه کارشناسی ارشد زراعت. دانشگاه مازندران.

زربافی، س.، ربیعی، ب، و عبادی، ع.ا. ۱۳۹۸. غربال ژنوتیپ‌های برنج (*Oryza sativa* L.) برای تحمل و حساسیت به بلاست برگ تحت شرایط آلودگی مصنوعی در مزرعه. تحقیقات غلات ۹(۳): ۲۰۶-۱۹۳.

عابدی، ف.، بابائیان، ن. د.، مؤمنی، ع. و نعمت‌زاده، ق. ع. ۱۳۹۰. بررسی مقاومت نسبی گیاهچه‌های برخی ارقام برنج نسبت به عامل بلاست (*Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr) در شرایط مزرعه و گلخانه. مجله دانش زراعت ۲(۴): ۳۱-۴۲.

فهیمی‌فر، ج. ۱۳۷۰. بازار جهانی برنج. انتشارات موسسه مطالعات و پژوهش های بازرگانی. ۵۰۵ صفحه.

مرادی، ز.، سالاری، م.، رمضانی، م، مؤمنی، ع. و موسی‌نژاد، ص. ۱۳۸۸. تجزیه ژنتیکی مقاومت برنج به بلاست برگ با استفاده از طرح دای‌آلل. دانش گیاهپزشکی ایران ۴۰(۲): ۱۱۶-۱۰۹.

موسی‌نژاد، ص.، مومنی، ع. و نیک خواه م. ج. ۱۳۸۹. ارزیابی اجزای مقاومت به بیماری بلاست در تعدادی از ارقام برنج. بیماری‌های گیاهی ۴۶(۱): ۱۹۲-۱۸۱.

مؤمنی، ع.، پاداشت دهکایی، ف.، موسی نژاد، ص. و نیک‌خواه ج. م. ۱۳۸۵. تعیین اجزای مقاومت کاهنده بلاست در ارقام منتخب برنج. دانش کشاورزی ۱۶(۳): ۱۴۴-۱۳۵.

Cho, Y.C., Choi, I.S., Baek, M.K., Suh, J.P., Hong, H.C., Kim, Y.G., Koizumi, S., Jena, K.K., Choi, H.C. and Hwang, H.G. 2003. Resistant genes and their effects to rice blast in isogenic lines of genetic background of Chucheongbyeo and Suweon 345. Rice Genet. News 20: 101-105.

Cho, Y., Kwon, S., Choi, I., and Lee, S. 2007. Identification of major blast resistance genes in Korean rice varieties (*Oryza sativa* L.) using molecular markers. Journal of Crop Science10: 265–276

Jennings, P. R., L.E. Berrio, E. Torres and E. Corredor. 2003.A breeding strategy to increase rice yield potential. Webapp. Ciat. cigiar. org/biotechnology/pdf/Jennings/pdf Accessed on 2rd October.

Jeon, J.S., Chen, D., Yi, G.H., Wang, G.L. and Ronald, P.C. 2003. Genetic and physical mapping of Pi5(t), a locus associated with broad-spectrum resistance to rice blast. Molecular Genetic Genomics 269: 280-289.

Singh, A. K., Singh, P. K. Arya, M., Singh, N. K. and Singh. U. S. 2015. Molecular screening of blast resistance genes in rice using SSR markers. Plant Pathology Journal 31(1): 12–24.

Identification of the blast-resistant genes in the rice genotypes in northern Iran using molecular markers

M. Farifteh[1], B. Morid[2*] and H. R. Zamani Zadeh[3]

Received: 2 May, 2023 Accepted: 11 Jul., 2023

ABSTRACT

Blast disease caused by *Magnaporthe grisea* is a significant threat to rice worldwide, leading to substantial damage and yield losses. The most effective method for controlling this disease is through the use of resistant rice cultivars that carry specific resistance genes. In this study, three primers (Yca7, Nsb, and JJ718) were used associated with the *Pia*, *Pib*, and *Pi5* resistance genes, respectively, to identify blast-resistant rice cultivars and lines. At first, DNA was extracted from the leaves of 10-day-old seedlings of the entered rice cultivars and lines using the CTAB method. Subsequently, polymerase chain reaction (PCR) and electrophoresis were conducted to amplify and analyze the resulting DNA bands with the respective primers. Our findings indicated that Qaim and Gilane cultivars carry the Pia resistance gene, making them probable candidates for rice blast disease resistance. Similarly, all tested cultivars (excluding Sahel) possess the *Pib* resistance gene, suggesting their resistance to blast disease. Furthermore, except for Sepidrood and Sahel cultivars, all cultivars tested positive for the *Pi5* resistance gene, indicating their ability to resist blast disease. Based on these results, Qaim and Gilane cultivars exhibit resistance to the disease as they carry all three resistance genes, while Sahel cultivar lacks all three resistance genes, making it the most susceptible cultivar in our study.

Key words: Rice Blast Disease, Resistance gene, *Pia*, *Pib*, *Pi5*

1 and 3. Former Master Student and Professor, respectively, Department of Plant Pathology, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Takestan Branch, Islamic Azad University, Qazvin, Iran

Corresponding author: bahar_iris@yahoo.com