دانشکده علوم زراعی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد در رشته اصلاح نباتات

موضوع:

ارزیابی مقاومت به بیماری بلاست در لاین های مختلف برنج (*Oryza sativa* L.)

اساتید راهنما:

دکتر نادعلی بابائیان جلودار
دکتر نادعلی باقری

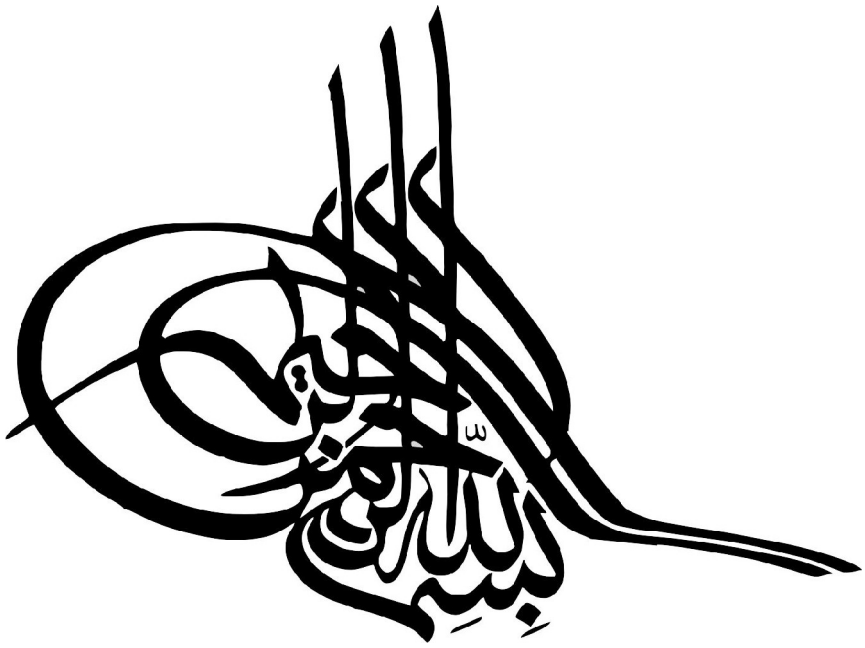
استاد مشاور:

دکتر قربانعلی نعمت زاده

نام دانشجو:

آرام پاشا

بهمن ماه ۱۳۹۱


بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم زراعی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد در رشته اصلاح نباتات

موضوع:

ارزیابی مقاومت به بیماری بلاست در لاین های مختلف برنج (*Oryza sativa* L.)

اساتید راهنما:

دکتر نادعلی بابائیان جلودار
دکتر نادعلی باقری

استاد مشاور:

دکتر قربانعلی نعمت زاده

نام دانشجو:

آرام پاشا

بهمن ماه ۱۳۹۱

سپاسگزاری

رسول خدا فرمودند:

« من علمنی حرفا فقد سیرنی عبدا »

خداوندا تو را سپاس که جامعهٔ بشری را به زیور علم و دانش آراستی و انسان و انسانیت را فرهنگ و تعالی بخشیدی. اکنون که در پرتو عنایات الهی، رهنمودهای اساتید فرزانه و مساعدت دوستان، پژوهش حاضر را به انجام رسانیده‌ام، وظیفهٔ خود میدانم از تمام عزیزانی که در این راستا یاریم داده‌اند، سپاسگزاری نمایم. چونکه: من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق.

بر خود واجب می دانم از اساتید بزرگوارم جناب آقایان دکتر نادعلی بابائیان جلودار و دکتر نادعلی باقری که زحمت راهنمایی این پژوهش را تقبل فرمودند و با حوصله در تمام مراحل انجام پژوهش مرا مرهون بزرگواریشان فرمودند، تشکر نمایم. همچنین از آقای دکتر قربانعلی نعمت زاده که اینجانب را از مشورت های مفید خویش بهره مند نمودند، سپاسگزارم.

از اساتید محترم آقایان دکتر حمید نجفی و دکتر غفار کیانی که زحمت داوری و تصحیح این پژوهش را بر عهده داشتند، سپاسگزارم. همچنین از نماینده تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر تاجیک سپاسگزارم.

از مسئول محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی جناب آقای مهندس اسماعیل حسن نتاج به خاطر کمک ارزنده ایشان در روند انجام پایان نامه تشکر می نمایم. از آقایان مهندس عمار افخمی، حامد صالحیان و وحید خسروی که در اجرای این پژوهش مساعدت نمودند، کمال تشکر را دارم.

از تمامی دوستان و همکلاسی هایم که که همواره امید بخش روند انجام پایان نامه بودند کمال تشکر را دارم.

در نهایت؛

از تمامی معلمان، استادان، دوستان و خانواده ام در کل دوران تحصیل سپاسگزارم.

تقدیم به:

پیشگاه مقدس قطب عالم امکان بقیه الله الاعظم روحی و اروحنا لتراب مقدمه الفداء

تقدیم به:

پدر بزرگوار و مادر صبورم

که وجودم برایشان همه رنج بود و وجودشان برایم همه مهر

تقدیم به:

همسر مهربان و فداکارم

که همواره در زندگی یار و مشوقم بوده و هست.

تقدیم به:

پسر خوب و نازنینم

که دوری مرا تحمل می کرد.

تقدیم به:

برادر و خواهران مهربانم

که امید سبزشان همواره موجب دلگرمی ام بوده است

چکیده

بلاست (*Magnaporthe grisea*) یکی از مهمترین بیماری های برنج در ایران می باشد که سبب کاهش شدید عملکرد در ارقام حساس می شود. در این تحقیق تعداد ۵۸ ژنوتیپ برنج همراه با دو رقم نعمت و بینام به ترتیب به عنوان شاهد مقاوم و حساس منطقه و ارقام IR1552 و B40 به ترتیب بعنوان شاهد مقاوم و حساس بین المللی جهت مقاومت به بلاست در سال ۱۳۹۰ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری مورد ارزیابی قرار گرفتند. مقایسه میانگین درصد سطح برگ آلوده به بلاست در ژنوتیپ های برنج مورد مطالعه نشان می دهد که تعداد ۹ ژنوتیپ (IR 04A325، IR 05A103، 4-2-3-2 IR 70213-10-CPA، IR 57514-PMI 5-B-1-2، CT 19561-3-20-2-3-2-2-M، CT 18667-6-6-1-5-1، IR 06L138، CT 18615-1-5-1-2-1 و IR 72768-12-1-1) کمترین درصد سطح برگ آلوده به بلاست (کمتر از ۲ درصد) را داشتند. ارزیابی میانگین تیپ آلودگی به بلاست برگی در ژنوتیپ های مختلف برنج نشان داد که ژنوتیپ های مورد مطالعه در سه گروه مقاوم (تیپ آلودگی ۲-صفر)، نیمه مقاوم (تیپ آلودگی ۳-۲/۱) و حساس (تیپ آلودگی۵-۳/۱) قرار گرفته اند، به طوریکه تعداد ۱۸ ژنوتیپ در گروه مقاوم، ۲۸ ژنوتیپ از جمله شاهدهای مقاوم محلی (نعمت) و بین المللی (IR1552) در گروه نیمه مقاوم و ۱۶ ژنوتیپ از جمله شاهدهای حساس محلی (بینام) و بین المللی (B40) در گروه حساس قرار گرفتند. مقایسه میانگین شدت بلاست خوشه (PBS) نشان داد که ژنوتیپ های IRBL5-M و IRBL11-ZH به ترتیب با ۳/۲۸ و ۶/۲۳ درصد کمترین و ژنوتیپ VNIIR 10200 (SHARM)، بیشترین ($\overline{X}$ = ۳۷/۵۵) درصد شدت بلاست خوشه را داشتند. نتایج ارزیابی مزرعه ای مقاومت به بلاست برگ و خوشه نشان می دهد که از بین ژنوتیپ های مورد مطالعه ۲ ژنوتیپ (CT 19561-3-20-2-3-2-2-M و IR 72768-12-1-1) در مرحله برگی و خوشه به بیماری بلاست مقاوم بودند و تنها ژنوتیپ FLAGMAN هم در مرحله برگی و هم در مرحله خوشه به بلاست حساس بود. تعداد ۲ ژنوتیپ (IRBL5-M و WAB 878SG33) در مرحله برگی حساس به بلاست اما در مرحله خوشه به بلاست مقاوم بودند. تعداد ۲۹ ژنوتیپ که در ارزیابی مزرعه ای از نظر بلاست خوشه واکنش مقاوم و یا نیمه مقاوم بودند در آزمایش گلخانه ای با سه ایزوله بلاست IA-25، IA-82 و Iran-47 جهت بررسی مقاومت آنها به بیماری بلاست در مرحله خوشه مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تعداد ۱۵ ژنوتیپ (IRBLTA2-RE، IRBLZT-T، AOQINGZHAN، CT 18615-1-5-1-2-1، CT 18667-6-6-1-5-1، CT 19561-3-20-2-3-2-2-M، IET 13245، IR 57514-PMI 5-B-1-2، IR 70213-10-CPA 4-2-3-2، IR 04A325، IR 05A103، IR 06L138، IR 06L160، IR 06L164 و VNIIR 10211) در شرایط گلخانه ای نسبت به ایزوله های مورد آزمایش واکنش مقاوم (R) نشان دادند. همچنین ژنوتیپ های برنج بر اساس نشانگرهای RGA به ۶ خوشه گروه بندی شدند بطوریکه گروه I شامل ۹ ژنوتیپ مقاوم (L46، L49، L47 وL50، L48، L36،L33، L35 و L51) با دامنه شدت بلاست برگی ۲- ۰/۹۵ درصد و گروه VI شامل ۹ ژنوتیپ حساس (L10، L9، L37، L22، L8، L45، L23، L20 و L62) با دامنه شدت بلاست برگی ۴۴/۶۷- ۳۱/۳۳ درصد می باشند. در گروه بندی ژنوتیپ های برنج مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای RM244، RM206 و RM144 (نشانگرهای همبسته با ژن *Pi-1* روی کروموزوم ۱۱ برنج)، ژنوتیپ های برنج در سه گروه قرار گرفتند بطوریکه تعداد ۲۳ ژنوتیپ از جمله ژنوتیپ نعمت (شاهد مقاوم محلی) به همراه رقم C101LAC در گروه مقاوم قرار داشتند. تعداد ۲۵ ژنوتیپ از جمله ارقام بینام (شاهد حساس) و IR1552 (شاهد مقاوم) در گروه نیمه مقاوم قرار گرفتند و تعداد ۱۵ ژنوتیپ برنج از جمله ژنوتیپ B 40 در گروه حساس قرار گرفتند.

واژه های کلیدی: بلاست، ارزیابی مزرعه ای و گلخانه ای، مقاومت، نشانگرهای RGA و SSR.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه..... ۱

فصل اول - بررسی بلاست برنج و روش‌های کنترل آن ۳

۱ - ۱ - تاریخچه.....۳

۱ – ۲ - عامل بیماری.....۴

۱ – ۳ – علائم بیماری.....۴

۱ – ۴ – چرخه بیماری ۵

۱ – ۵ – خسارت بیماری.....۷

۱ – ۶ – نژادهای فیزیولوژیک قارچ عامل بیماری بلاست.....۸

۱ – ۷ – روش های کنترل بیماری بلاست.....۱۰

۱ – ۷ - ۱ – مقاومت به بیماری بلاست در گیاه برنج.....۱۰

۱ – ۷ - ۲ – پیش‌آگاهی بلاست.....۱۱

۱ – ۷ - ۳ - مبارزه بیولوژیک.....۱۳

۱ – ۷ – ۴ - کنترل شیمیایی بیماری بلاست.....۱۴

۱ – ۷ - ۴ - ۱- اهمیت مبارزه شیمیایی.....۱۴

۱ – ۷ – ۴ - ۲ - سابقه مبارزه شیمیایی با بیماری بلاست.....۱۴

۱ – ۷ – ۴ - ۳ - مقاومت به قارچکشها.....۱۵

فصل دوم - مقاومت به بیماری های گیاهی.....۱۶

۲ – ۱ – ژنتیک اثر متقابل میزبان – پاتوژن ۱۶

۲ – ۲ – اصلاح برای مقاومت به امراض.....۱۶

۲ – ۳ – مکانیزم های مقاومت به امراض.....۱۸

۲ – ۳ – ۱ - مقاومت در برابر پاتوژن.....۱۸

۲ – ۳ – ۲ - مقاومت در مقابل پاتوژن استقرار یافته.....۱۹

۲ – ۳ – ۳ - اصلاح برای مقاومت خصوصی.....۱۹

۲ – ۳ – ۴- ارقام دارای تک ژن های اصلی.....۱۹

۲ – ۳ – ۵ – واریته های ترکیبی.....۲۰

۲ – ۳ – ۶ - هرمی کردن ژن ها.....۲۰

۲ – ۳ - ۷- کاهش تغییر در نژادها.....۲۰

۲ – ۳ - ۸- نگهداری نژادهای شایع.....۲۱

۲- ۳ - ۹- جلوگیری از ظهور نژادهای جدید ۲۱

۲- ۳ - ۱۰- حداقل نمودن برخورد با نژادهای جدید.....۲۲

فصل سوم - اهمیت و استفاده از آنولوگ های ژن های مقاومت (RGAs)..... ۲۳
۳ – ۱ – مقدمه ۲۳
۳ – ۲ - کلونینگ ژن های مقاومت به بیماری ۲۴
۳ – ۳ - ساختار ژن های مقاومت به بیماری..... ۲۶
۳ – ۴ - طبقه بندی ژن های مقاومت به بیماری..... ۲۶
۳ – ۵ - سنتز آغازگرهای دژنره..... ۲۶
۳ - ۶- جداسازی RGAs ۲۶
۳ - ۷- کلونینگ RGAs ۲۷
۳ - ۸- خصوصیات RGA ۲۷
۳ - ۹- مفاهیم آنالوگ های ژن مقاومت..... ۲۷
۳ - ۱۰- آنالوگ های ژن مقاومت و نقشه یابی ژن مقاومت ۲۹
۳ - ۱۱- آنالوگ های ژن مقاومت و مطالعات تکاملی..... ۳۰

فصل چهارم - ژن های مقاوم و انتخاب نشانگرهای DNA برای بیماری بلاست در برنج..... ۳۲
۴ – ۱ – مقدمه ۳۲
۴ - ۲- بررسی اجمالی از ژن های مقاومت به بلاست..... ۳۲
۴ – ۲ - ۱- تعداد ژن های مقاومت به بلاست برنج..... ۳۳
۴ – ۲ - ۲- خصوصیات ژن های مقاومت کلون شده..... ۳۳
۴ – ۲ – ۳ - مکان ژن های مقاومت..... ۳۴
۴ – ۲ – ۴ - مقاومت نسبی..... ۴۳
۴ - ۲- ۵ - نژادهای بخشنده ۴۳
۴ – ۳ - مشکلاتی در مطالعه ژن های مقاومت به بلاست..... ۴۴
۴ – ۳ - ۱- روش فهرست بندی..... ۴۴
۴ – ۳ - ۲- شناسایی ژن..... ۴۴
۴ – ۴ - استفاده از MAS برای ژن های مقاومت به بلاست..... ۴۵
۴ – ۴ - ۱- مزایای نشانگرهای مولکولی برای گزینش ژن های مقاوم..... ۴۵
۴ – ۴ - ۲- نشانگرهای مناسب برای MAS..... ۴۵
۴ – ۴ – ۳ - نشانگرهای که برای مشخص کردن ژن های مقاومت به بلاست برنج توسعه یافته اند..... ۴۶
۴ - ۵- آینده MAS برای ژن های مقاومت به بلاست..... ۵۷
۴ – ۵ - ۱- نوترکیبی بین نشانگرها و ژن ها..... ۵۷
۴ – ۵ – ۲ - کشش لینکاژی..... ۵۷
۴ – ۵ – ۳ - محدودیت برای عمومی شدن نشانگرها..... ۵۷

فصل پنجم - بررسی ژنوتیپ های برنج از نظر مقاومت به *Magnaporthe grisea* در شرایط مزرعه ای.....۵۹
۵ – ۱ – چکیده ۵۹
۵ – ۲ – مقدمه.....۶۰
۵ – ۳ – مواد و روش ها.....۶۱
۵ – ۳ – ۱- ارزیابی بیماری بلاست برگی در خزانه بلاست.....۶۱
۵ – ۳ – ۲- اندازه گیری اجزای مقاومت به بیماری درخزانه بلاست.....۶۲
۵ – ۳ – ۲ – ۱ – الف –) درصد سطح برگ آلوده به بلاست.....۶۳
۵ – ۳ – ۲ – ۲- ب-) تیپ آلودگی به بلاست برگی.....۶۴
۵ – ۳ – ۳ – ارزیابی بلاست خوشه در مزرعه.....۶۴
۵ – ۳ – ۴ – اندازه گیری اجزای مقاومت به بیماری بلاست خوشه.....۶۵
۵ – ۳ – ۴ – ۱- الف-) درصد شدت بلاست خوشه.....۶۵
۵ – ۳ – ۴ – ۲- ب-) تیپ آلودگی به بلاست خوشه.....۶۶
۵ – ۳ – ۵- تجزیه و تحلیل آماری.....۶۶
۵ – ۴ – نتایج ۶۷
۵ – ۴ – ۱- بلاست برگی.....۶۷
۵ – ۴ – ۱- ۱- درصد سطح برگ آلوده به بلاست برگی.....۶۷
۵ – ۴ – ۱ – ۲ – تیپ آلودگی به بلاست برگی.....۶۸
۵ – ۴ – ۲- بلاست خوشه.....۷۲
۵ – ۴ – ۲ – ۱- شدت بلاست خوشه.....۷۲
۵ – ۵ – بحث.....۷۸

فصل ششم - ارزیابی گلخانه ای ژنوتیپ های مختلف برنج از نظر مقاومت به بلاست.....۸۰
۶ – ۱ – چکیده ۸۰
۶ – ۲ – مقدمه.....۸۰
۶ – ۳ – مواد و روش ها.....۸۳
۶ – ۳ – ۱- مواد گیاهی مورد استفاده.....۸۳
۶ – ۳ – ۲- نژادهای مورد استفاده و مایه زنی.....۸۴
۶ – ۳ – ۳ – اندازه گیری اجزای مقاومت به بیماری بلاست در آزمایش گلخانه ای.....۸۵
۶ – ۳ – ۴ – روش تلقیح برای ارزیابی مقاومت بلاست خوشه در آزمایش گلخانه ای.....۸۵
۶ – ۴ – تجزیه و تحلیل آماری.....۸۶
۶ – ۵ – نتایج و بحث.....۸۷

فصل هفتم - رابطه بین فنوتیپ های مقاومت به بلاست و پروفایل های آنالوگ ژن مقاومت در برنج....۱۰۰
۷ – ۱ – چکیده ۱۰۰
۷ – ۲ – مقدمه ۱۰۰
۷ – ۳ – مواد و روش ها ۱۰۱
۷ – ۳ - ۱- مواد گیاهی.....۱۰۱
۷ – ۳ - ۲- ارزیابی مقاومت به بلاست برگی در خزانه بلاست.....۱۰۱
۷ – ۳ - ۳- تهیه نمونه برگی.....۱۰۲
۷ – ۳ – ۴ - استخراج (دی. ان. ا) DNA.....۱۰۲
۷ – ۳ - ۵- تعیین کمیت و کیفیت دی. ان. آ.....۱۰۴
۷ – ۳ – ۵ - ۱- تعیین کمیت دی. ان. آ از طریق اسپکتروفوتومتر.....۱۰۴
۷ – ۳ – ۵ - ۲- تعیین کمیت و کیفیت دی. ان. آ به وسیله الکتروفورز ژل آگارز.....۱۰۵
۷ – ۳ – ۶ - آغازگرها.....۱۰۶
۷ – ۳ – ۷ - تنظیم شرایط برای پی. سی. آر و نکات مربوطه.....۱۰۶
۷ – ۳ – ۸ - بارگذاری نمونه ها و اجرای الکتروفورز.....۱۰۸
۷ – ۴ - تجزیه های آماری.....۱۰۸
۷ – ۵ - نتایج ۱۰۸
۷ – ۵ - ۱- ارزیابی فنوتیپی مقاومت ژنوتیپ های مختلف برنج.....۱۰۸
۷ – ۵ – ۲ - دسته بندی ژنوتیپ ها با استفاده از تشابه RGA ها.....۱۱۱
۷ – ۵ – ۳ - رابطه بین فنوتیپ مقاومت به بلاست و پروفایل های RGA.....۱۱۷
۷ – ۵ – ۴ - رابطه بین تنوع مقاومت و لینکاژ در ژنوتیپ های برنج.....۱۱۸
۷ – ۶ – بحث ۱۱۸
۷ – ۶ - ۱- انتخاب و تعداد آغازگرهای RGA ۱۱۸
۷ – ۶ - ۲- RGA-PCR و فنوتیپ های مقاومت.....۱۱۹

فصل هشتم - غربالگری ژنوم برنج برای ژن *Pi-1* با استفاده از نشانگرهای میکروساتلایت.....۱۲۰
۸ – ۱ – چکیده ۱۲۰
۸ – ۲ – مقدمه ۱۲۰
۸ – ۳ – مواد و روش ها ۱۲۱
۸ – ۳ - ۱- ارزیابی مزرعه ای.....۱۲۱
۸ – ۳ – ۲ - ارزیابی مولکولی.....۱۲۲
۸ – ۴ - تجزیه آماری.....۱۲۲
۸ – ۵ - نتایج و بحث.....۱۲۲
منابع ۱۳۳

فهرست شکلها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- بلاست برگی (الف) و بلاست گردن خوشه (ب) در برنج..... ۵

شکل ۱- ۲- بلاست گره های پایینی ساقه (الف) و بلاست یقه برگ (ب) در برنج..... ۵

شکل ۱- ۳- چرخه بیماری بلاست برنج..... ۶

شکل ۴- ۱- مکان ژن های مقاومت به بلاست برنج گزارش شده تا سال ۲۰۰۸..... ۴۲

شکل ۵- ۱- مراحل آماده سازی زمین (الف)، کشت (ب)، رشد (ج) و اندازه گیری اجزای مقاومت به..... ۶۲

شکل ۵ – ۲ – سطح برگ آلوده به بلاست بر اساس مقیاس بین المللی..... ۶۳

شکل ۵- ۳- نمایی از مزرعه آزمایشی (الف) - درصد شدت بلاست خوشه، ....(ب) - ۶۴

شکل ۵- ۴- سطح زیر منحنی توسعه بیماری (AUDPC) بلاست برگ ژنوتیپ های مختلف برنج در خزانه بلاست..... ۶۸

شکل ۵- ۵- توزیع فراوانی ژنوتیپ های برنج مورد مطالعه بر اساس تیپ آلودگی به بلاست برگی..... ۶۸

شکل ۵- ۶ - دندروگرام حاصل از صفات تیپ آلودگی به بلاست برگی و درصد سطح برگ آلوده به بلاست..... ۷۱

شکل ۵- ۷- توزیع فراوانی ژنوتیپ های برنج مورد مطالعه بر اساس تیپ آلودگی به بلاست خوشه..... ۷۲

شکل ۵- ۸ - دندروگرام حاصل از صفات شدت بلاست خوشه (PBS) و تیپ بلاست خوشه در شرایط مزرعه..... ۷۵

شکل ۶- ۱- ارزیابی مقاومت به بلاست برگی در شرایط گلخانه ای..... ۸۳

شکل ۶- ۲- نژادهای بلاست مورد استفاده (الف- ایزوله IA-25، ب- IA-82 و ج – Iran-47) در آزمایش..... ۸۴

شکل ۶ - ۳- اسپور نژادهای بلاست..... ۸۴

شکل ۶- ۴ - ارزیابی واکنش ژنوتیپ های برنج در مقابل بیماری بلاست خوشه در گلخانه..... ۸۶

شکل ۶- ۵- دندروگرام حاصل از صفات تیپ آلودگی، تعداد لکه اسپورزا،... برای ایزوله IA-25 بلاست..... ۹۰

شکل ۶-۶- دندروگرام حاصل از صفات تیپ آلودگی، تعداد لکه اسپورزا، ... برای ایزوله IA-82 بلاست..... ۹۲

شکل ۶- ۷- دندروگرام حاصل از صفات تیپ آلودگی، تعداد لکه اسپورزا، ... برای ایزوله Iran-47 بلاست..... ۹۴

شکل ۷- ۱- تصویری از حمام آب گرم در فرایند استخراج DNA..... ۱۰۲

شکل ۷- ۲- تصویری از دستگاه الکتروفورز در حال ران کردن نمونه های DNA استخراج شده..... ۱۰۵

شکل ۷- ۳- نمونه DNA استخراجی تعدادی از ژنوتیپ های مورد مطالعه در این آزمایش..... ۱۰۶

شکل ۷- ۴– دندروگرام ژنوتیپ های برنج مورد مطالعه بر اساس شدت بلاست برگی..... ۱۱۰

شکل ۷- ۵- الگوی باندی محصولات PCR آغازگر XLRR-inv روی ژل آگارز ۲/۵ درصد..... ۱۱۱

شکل ۷- ۶ - الگوی باندی محصولات PCR آغازگرآغازگر XLRR روی ژل آگارز ۲/۵ درصد..... ۱۱۱

شکل ۷- ۷ - الگوی باندی محصولات PCR آغازگر NLRR-inv روی ژل آگارز ۲/۵ درصد..... ۱۱۱

شکل ۷- ۸ - دندروگرام ۶۲ ژنوتیپ برنج بر اساس RGA1-PCR..... ۱۱۳

شکل ۷- ۹ - دندروگرام ۶۲ ژنوتیپ برنج بر اساس RGA2-PCR..... ۱۱۴

شکل ۷- ۱۰- دندروگرام ۶۲ ژنوتیپ برنج بر اساس RGA3-PCR..... ۱۱۵

شکل ۷- ۱۱- دندروگرام ۶۲ ژنوتیپ برنج بر اساس هر سه آغازگر..... ۱۱۶

شکل ۸- ۱ - الگوی باندی محصول PCR آغازگر RM224 روی ژل آگارز ۲ درصد..... ۱۲۴

شکل ۸-۲-الگوی باندی محصول PCR آغازگر RM144 روی ژل آگارز ۲ درصد.....۱۲۴
شکل ۸- ۳- الگوی باندی محصول PCR آغازگر RM206 روی ژل آگارز ۲ درصد.....۱۲۴
شکل ۸- ۴– دندروگرام ژنوتیپ های برنج مورد مطالعه بر اساس شدت بلاست برگی.....۱۲۷
شکل ۸- ۵ – گروه بندی ژنوتیپ های برنج بر اساس نتایج حاصل از محصولات PCR نشانگر RM244.....۱۲۸
شکل ۸- ۶– گروه بندی ژنوتیپ های برنج بر اساس نتایج حاصل از محصولات PCR نشانگرRM206 .....۱۲۹
شکل ۸- ۷ – گروه بندی ژنوتیپ های برنج بر اساس نتایج حاصل از محصولات PCR نشانگر RM144.....۱۳۰
شکل ۸- ۸ – گروه بندی ژنوتیپ های برنج بر اساس نتایج حاصل از محصولات PCR هرسه نشانگر..... ۱۳۱

فهرست جدولها

عنوان **صفحه**

جدول ۳ – ۱- کلاس های اصلی ژن های مقاومت به بیماری گیاهی که کلون شده اند..... ۳۱

جدول ۴- ۱- ژن های مقاومت به بلاست برنج..... ۳۶

جدول ۴-۲- نشانگرهای DNA که برای ژن های مقاومت به بلاست برنج مورد استفاده قرار می گیرند ۴۷

جدول ۵- ۱ - تجزیه واریانس درصد سطح برگ آلوده به بلاست ژنوتیپ ها در شرایط مزرعه ای..... ۶۶

جدول ۵ -۲ - میانگین تیپ آلودگی و سطح برگ آلوده به بلاست و AUDPC در ژنوتیپ های برنج در خزانه..... ۷۰

جدول ۵- ۳ - تجزیه واریانس درصد شدت بلاست خوشه در ژنوتیپ های مختلف برنج در شرایط مزرعه ای..... ۷۲

جدول ۵- ۴ – میانگین صفات شدت بلاست خوشه (PBS)، تیپ آلودگی خوشه و سه صفت زراعی..... ۷۴

جدول ۵- ۵ – ضرایب همبستگی بین صفات شدت بلاست خوشه (PBS)، تیپ آلودگی خوشه و..... ۷۶

جدول ۵- ۶ – واکنش ژنوتیپ های برنج مورد مطالعه به بلاست برگی و بلاست خوشه در شرایط مزرعه ای..... ۷۷

جدول ۵ – ۷- ارزیابی بلاست برگی تعدادی از ژنوتیپ هایی که در بیست و نهمین خزانه ۷۹

جدول ۶- ۱- تجزیه واریانس صفات تعداد لکه اسپورزا، درصد سطح برگ آلوده و..... ۸۷

جدول ۶- ۲- میانگین صفات مطالعه شده برای مقاومت به بلاست برگ در ۸۸

جدول ۶-۳- واکنش ژنوتیپ های برنج به ایزوله های بلاست مورد مطالعه در مرحله برگی در شرایط گلخانه ای..... ۹۶

جدول ۴ - ۶ – واکنش ژنوتیپ های برنج به بلاست خوشه نسبت به ایزوله های مورد مطالعه در شرایط گلخانه ای..... ۹۷

جدول ۷- ۱- جفت آغازگرهای RGA مورد استفاده در این مطالعه..... ۱۰۶

جدول ۷- ۲- مواد مورد نیاز و مقادیر هر کدام از آنها برای تهیه محلول مادری..... ۱۰۷

جدول ۷ -۳- دوره های حرارتی بهینه شده برای اجرای واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)..... ۱۰۷

جدول ۷- ۴ - شدت بلاست برگی ژنوتیپ های مختلف برنج..... ۱۰۹

جدول ۷- ۵- گروه بندی ۶۲ ژنوتیپ برنج براساس هر یک از آغازگر های RGA به تنهایی و ۱۱۲

جدول ۷-۶- چند شکلی ژنوتیپ های مختلف برنج بر اساس ۳ جفت آغازگر RGA ۱۱۷

جدول ۸- ۱ - شدت بلاست برگی ژنوتیپ های مختلف برنج..... ۱۲۵

جدول ۸- ۲- گروه بندی ۶۳ ژنوتیپ برنج براساس هر یک از آغازگر های SSR به تنهایی و ۱۲۶

جدول ۸- ۳- ضرایب همبستگی ساده داده های حاصل از نشاگرهای SSR (RM244، RM206 و RM144) ۱۳۲

لیست علایم و اختصارات

IRRI	موسسه تحقیقات بین المللی برنج (International Rice Research Institute)
MAS	انتخاب به کمک نشانگر (Marker-assisted selection)
ORFs	چهار چوب خواندن باز (Open reading frames)
PCR	واکنش زنجیره ای پلیمراز (Polymerase chain reaction)
SSR	توالی ساده تکراری (Simple sequence repeats)

avr = Avirulence protein

CC = Coiled coil

CIMMYT = International maize and wheat improvement centre

DNA = Deoxyribonucleic acid

eLRR = Extracellular leucine-rich repeat

LRR = Leucine-rich repeat

LCD = Localized cell death

NBS = Nucleotide binding site

ORF = Open reading frame

PCR = Polymerase chain reaction

R = Resistance protein

RFLP = Restriction fragment length polymorphism

RGA = Resistance gene analog

ROS = Reactive oxygen species

TIR = Toll and Interleukin-1 receptor

YAC = Yeast artificial chromosome

Assessment of resistance to Magnaporthe grisea in rice (*Oryza sativa* L.) lines

Abstract

Blast (*Magnaporthe grisea*) is one of the most important diseases of rice in Iran which causing of production severe loss in susceptible rice cultivars. In this study, 58 genotypes of rice with Nemat and Binam cultivars, resistant and susceptible local controls, respectively and rice cultivars of IR1552 and B40 as resistant and susceptible international controls, respectively were evaluated for resistance to blast at Sari, Iran in 2011. Means comparison of infected leaf area percent to blast in rice genotypes shows that 9 genotypes (IR 04A325, IR 05A103, IR 70213-10-CPA 4-2-3-2, IR 57514-PMI 5-B -1-2, CT 19561-3-20-2-3-2-2-M, CT 18667-6-6-1-5-1, IR 06L138, CT 18615-1-5-1-2-1 , IR 72768-12-1-1) had the lowest percentage of infected leaf area to blast (Infected leaf range from 0.92 to 2.0 percent). Comparison of means for leaf blast infection type in different genotypes of rice showed that 29.03% of genotypes in the resistant group (infection type of 0.0 to 2.0), 45.16% of genotypes included local (Nemat) and international (IR1552) resistant controls in moderately resistant group (infection type of 2.1 to 3.0) and 25.81% of genotypes included local (Binam) and international (B40) susceptible controls with infection type of 3.1 to 5.0, are located in susceptible group. Means comparison of Panicle Blast Severity (PBS) showed that IRBL5-M and IRBL11-ZH genotypes, respectively, with 3.28 and 6.23 percent had the lowest and VNIIR10200 (SHARM) genotype, had the highest percentage ($\bar{X}$ = 37.55) of panicle blast Severity. The results of field evaluation of resistance to leaf and panicle blast showed that two genotypes (CT 19561-3-20-2-3-2-2-M and IR 72768-12-1-1) in leaf and panicle steps were resistant to blast disease and FLAGMAN genotype was susceptible. Number of two genotypes (IRBL5-M and WAB 878SG33) were susceptible in leaf step but were resistant in panicle step to blast. Number of 29 genotypes which in field evaluation showed resistant or and resistant moderately reaction to panicle blast, evaluating to blast disease in panicle step with IA-25, IA-82 and Iran-47 isolates in greenhouse. The results showed that 15 genotypes (IRBLTA2-RE, IRBLZT-T, AOQINGZHAN, CT 18615-1-5-1-2-1, CT 18667-6-6-1-5-1, CT 19561-3-20-2-3-2-2-M, IET 13245, IR 57514-PMI 5-B-1-2, IR 70213-10-CPA 4-2-3-2, IR 04A325, IR 05A103, IR 06L138, IR 06L160, IR 06L164 and VNIIR 10211) had resistant reaction to isolates used in experiment in greenhouse condition. Also rice genotypes were grouped to 6 clusters based on RGA markers, as the first group consisted of 9 resistant genotypes (L46, L49, L47, L50, L48, L36, L33, L35 and L51) with range of leaf blast severity from 0.95 to 2.0 percent and the sixth group consisted of 9 susceptible genotypes (L10, L9, L37, L22, L8, L45, L23, L20 and L62) with range of leaf blast severity from 31.33 to 44.67 percent. In grouping rice genotypes with RM244, RM206 and RM144 markers (markers linked with Pi-1 gene on 11 chromosome of rice), rice genotypes were grouped to three clusters, as number of 23 genotypes including Nemat (local resistant control) along with C101LAC cultivar were in resistant cluster. Number of 25 genotypes including Binam (local susceptible control) and IR1552 (resistant control) were in resistant moderately cluster and 15 rice genotypes including B40 were in susceptible cluster.

Key words: Blast, Field and greenhouse evaluation, Resistance, RGA and SSR Markers.

Sari Agricultural sciences and Natural Resources University

Department of Agronomy and Plant Breeding,
College of Agricultural Sciences

Subject:

Assessment of resistance to *Magnaporthe grisea* in rice (*Oryza sativa* L.) lines

A Thesis Submitted for the Degree of MS.c
In Plant Breeding

Superviser:

Dr. Nad-Ali babaeian jelodar

Dr. Nad-Ali bagheri

Advisor:

Dr. Ghorban-Ali nematzadeh

By:

Aram pasha

Feb. 2013

مقدمه

برنج یکی از مهم ترین و قدیمی‌ترین محصولات زراعی است که در دنیا کشت شده، بطوری که غذای بیش از نیمی از مردمان مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری را تشکیل می‌دهد. برنج در دنیا دارای سابقه پنج هزار ساله بوده که ابتدا در جنوب شرقی آسیا (هندوچین) کشت آن آغاز گردیده و سپس به سایر نقاط دنیا گسترش یافته است. در حال حاضر ۹۰ درصد برنج دنیا در جنوب شرقی آسیا تولید می‌گردد و در خارج از آسیا، کشورهای برزیل و ایالات متحده با تولید نیم درصد برنج مصرفی جهان، دارای سابقه دو هزار ساله کشت این محصول می باشند. استان های گیلان و مازندران از مناطق مهم تولید برنج در ایران به شمار می‌روند، البته غیر از این دو استان در ۱۶ استان دیگر کشور نیز برنج کشت می‌گردد (اخوت و دانش وکیلی، ۱۳۷۶). گونه زراعی مهم برنج (*Oryza sativa* L.) از خانواده Poaceae بوده که دارای تنوع ژنتیکی و توان سازگاری بالایی است و گونه زراعی دیگر آن (*Oryza glabrima*) است که در جنوب آفریقا کشت می‌شود (اخوت و دانش وکیلی، ۱۳۷۶).

گیاه برنج در طول دوره رشد در معرض آسیب عوامل زیان‌آور مختلف قرار می‌گیرد که یکی از عمده‌ترین آنها، قارچهای بیماریزای گیاهی هستند. در بین بیماریهای قارچی، بلاست بیشترین اهمیت اقتصادی را دارد. گرچه تخمین درستی از میزان کاهش محصول توسط این بیماری در ایران وجود ندارد، ولی به علت گرایش کشاورزان به کشت ارقام محلی حساس و مساعد بودن شرایط محیطی، همه ساله کشت برنج با کاهش محصول مواجه می شود (موسی نژاد و همکاران، ۱۳۸۸). بیماری بلاست که در اثر قارچ *Pyricularia grisea* ناشی می‌گردد، به علت گسترش وسیع و خسارت زدن به محصول در شرایط مساعد، عموماً به عنوان بیماری اصلی برنج به شمار می‌رود. این بیماری تا کنون از ۸۵ کشور جهان گزارش شده است و می‌توان گفت هر جایی که برنج بصورت تجاری و وسیع کشت می‌شود، این بیماری نیز وجود دارد (Mousanejad et al., 2010). بر اساس بخشی از گیاه که تحت تأثیر قرار می گیرد این بیماری به نامهای بلاست برگ، بلاست گردن خوشه و بلاست خوشه معروف می باشد. اگر گیاه در مرحله نشائی و یا پنجه زنی مورد حمله قرار گیرد، معمولاً از بین می‌رود. آلودگی گردن خوشه‌ها (به عنوان مهمترین بیماری برنج در اکثر کشورهای برنج‌خیز از جمله ایران بشمار می‌رود) باعث کاهش محصول می‌گردد (موسی نژاد و همکاران، ۱۳۸۸). متوسط کاهش سالانهٔ محصول به علت بلاست به ۱۱ تا ۳۰ درصد می رسد که کاهش محصولی حدود ۱۵۷ میلیون تن برنج را در سطح جهانی سبب می گردد (Mousanejad et al., 2010). به دلیل اهمیت بیماری بلاست تحقیقات گسترده‌ای برای کنترل آن از جنبه‌های مختلف صورت گرفته است، از جمله شناسایی و مصرف انواع قارچکشها، شناسایی منابع ژنی مقاومت و تهیه ارقام اصلاح شده مقاوم، معرفی سیستم‌های پیش‌آگاهی و بررسی عوامل اثر گذار در شدت و کاهش بیماری مانند عناصر غذایی، رطوبت، حرارت و غیره. استفاده از قارچکشها و بکارگیری ارقام مقاوم از راههای مهم کنترل بیماری بلاست می باشد ولی با توجه به اثرات نامطلوب زیست محیطی استفاده از قارچکشها، استفاده از ارقام مقاوم، بیشتر از سایر روش ها مورد توجه می باشد (پاداشت دهکایی و ایزدیار، ۱۳۸۵).

پیشرفت های اخیر در ژنومیکس برنج ما را قادر به استفاده از نشانگر های DNA برای اصلاح ارقام مقاوم کرده است. استفاده از توالی های همولوگ حفاظت شده ژن های عامل مقاومت یا ژن های مقاومت به بیماری به عنوان یکی از روش های کارآمد تشخیص و شناسایی ژن های مقاومت به شمار می رود. ژن های مقاومت به عوامل بیماریزای گیاهی شامل باکتری ها، ویروس ها، قارچ ها و نماتدها از گونه های مختلف جداسازی شده اند. مقایسه

توالی اسیدهای آمینه پروتئین های حاصل از ژن های مقاومت همسانه شده در گیاهان مختلف نشان داده است که در آنها تعدادی از موتیف های حفاظت شده وجود دارد (Baker et al., 1997). آنالوگ های ژن مقاومت (RGAs[1])، ژن های مقاومت به بیماری می باشند که بطور موثری مقاومت پایدار را ایجاد می کنند. بعبارتی آنالوگ های ژن مقاومت، محصولات تکثیر شده ای از طریق واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR[2]) از DNA ژنومی با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از توالی های حفاظت شده (نواحی حفاظت شده دارای آمینو اسید معین در ژن مقاومت، پروتئینی را کد می کند که جداسازی توالی های RGAs را از DNA ژنومی در بسیاری از گیاهان زراعی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز آسان می کند) می باشند که بعنوان ژن های مقاومت به بیماری شناخته شده اند (Egea-Gilabert, et al., 2004). RGAs ابزا مفیدی جهت شناسایی و ایزوله کردن ژن های مقاومت به بیماری می باشند و کاربرد واقعی RGAs شناسایی ژن هایی است که حقیقتا حامل فنوتیپ مقاوم می باشند (Kozjak et al., 2009; Ramasubramanian et al., 2008).

اهداف پژوهش:

- تعیین میزان توسعه بیماری بلاست برنج روی ارقام انتخابی با سطوح مختلف مقاومت با استفاده از جمعیت مزرعه ای *Pyricularia grisea*.
- ارزیابی فنوتیپی و اندازه گیری اجزای مقاومت با استفاده از نژادهای اختصاصی *Pyricularia grisea* در گلخانه.
- ارزیابی مولکولی مقاومت به بیماری بلاست برنج در ارقام مورد مطالعه.

[1] - Resistance Gene Analogs (RGAs)
[2] - Polymerase chain reaction (PCR)

بررسی بلاست برنج و روش‌های کنترل آن

۱-۱- تاریخچه

بیماری بلاست دارای تاریخچه نسبتاً طولانی است که به زمان های دور یعنی نیمه اول قرن هیجدهم میلادی بر می گردد (Ou, 1985). سونگ اینگ شین از چین احتمالاً اولین کسی بود که در سال ۱۶۳۷ در کتاب خود تحت عنوان استفاده از منابع طبیعی راجع به بیماری بلاست بحث کرد و از آن بعنوان سوختگی گیاهچه برنج نام برد. درآن زمان علت اصلی بروز بیماری را گرما یا تب می‌دانستند و شاید به همین خاطر آنرا بیماری تب برنج[1] می‌نامیده‌اند.

هم اکنون بیماری بلاست یکی از گسترش یافته‌ترین بیماری‌های گیاهی بوده و تا سال ۱۹۸۱ وقوع آن در ۸۵ کشور ثبت شده است. گسترش بیماری چنان است که در هر جا که برنج بصورت تجارتی و در مقیاس وسیع کشت می‌شود، بیماری وجود دارد و عامل آن قدرت سازگاری فوق‌العاده‌ای با شرایط محیطی مختلف دارد (Ou, 1985). چنانکه در خاورمیانه که برنج در شرایط حرارتی بالا و رطوبت نسبی پائین به صورت غرقابی کشت می شود، قارچ عامل بیماری فعال است و گره‌های گیاه برنج را درست در بالای سطح آب آلوده می‌کند، بدون اینکه علائمی از بیماری روی برگها و سایر بافت‌های گیاه ظاهر شود.

در ایران احتمالاً این بیماری از سالهای قبل در استانهای گیلان و مازندران وجود داشته و در اصطلاح محلی به آن پرسوز یا گل خشک گفته می‌شد، ولی گزارش مکتوب آن توسط شریف صورت گرفت که برای اولین بار در سال ۱۳۲۸ از لاهیجان آن را جمع‌آوری نمود (ایزدیار، ۱۳۷۷؛ بهداد، ۱۳۵۹). هم اکنون این بیماری در داخل کشور گسترش زیادی دارد و علاوه بر گیلان و مازندران در سایر نقاطی که کشت و کار برنج در آنها رواج دارد نیز شیوع پیدا کرده است. این بیماری تا سال ۱۳۴۸ که خسارت قابل توجهی به محصول برنج در شهرستان رودسر وارد کرد، اهمیت چندانی نداشت. علت شیوع این بیماری در مزارع شمال کشور به احتمال بسیار قوی مربوط به استفاده از کود شیمیایی نیتروژنه می‌باشد که مصرف آن از حدود سالهای ۴۷-۱۳۴۶ در این مناطق رایج شد. در ایران علاوه بر استان‌های شمالی در بسیاری از مزارع برنج مناطق دیگر از جمله فارس، خوزستان و کهکیلویه و بویراحمد نیز این بیماری وجود دارد و در برخی از سالها، با فراهم شدن شرایط مساعد، بصورت اپیدمی درآمده و سبب کاهش محصول می‌شود (ایزدیار، ۱۳۷۷).

در ایران خسارت بیماری در سال ۱۳۵۳ تقریباً ۱۰ درصد از کل محصول برنج برآورد گردید. از آن سال به بعد هر ساله بیماری بلاست سبب کاهش محصول در ارقام محلی می‌شود و در بعضی از سال‌ها به علت تداوم بارندگی و کاهش دما در تابستان خسارت شدیدی در ارقام زودرس و زود کاشت به بار آورده است، بطوریکه محصول بعضی مزارع قابل برداشت نبود. در اپیدمی سال ۱۳۷۳ بیماری مذکور، بیشترین خسارت در مزارع زود کاشت و در ارقام زودرس نظیر ارقام رضاجو، لاهیجانی‌جو و سنگ‌طارم که در مرحله ظهور خوشه و خوشه دهی بودند، مشاهده گردید در حالیکه ارقام اصلاح شده مقاوم مثل سپیدرود و بجار هیچگونه خسارت و علایمی از بیماری نداشتند.

[1] - Rice Fever Disease