

مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۴، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰

ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

تأثیر علف کش گلایفوسیت در بیان ژن های مرتبط با بیماری زایی و مقاومت در گیاهان سیب زمینی تراریخته آلوده شده با بیمارگر بادزدگی سیب زمینی



[20.1001.1.27170632.1400.14.1.2.9](https://doi.org/10.1001.1.27170632.1400.14.1.2.9)

حسین پاسالاری^{۱*}، آناتولی نیکلایوچ یوتوشنکوف^۲

۱- استادیار بخش کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، مجتمع آموزش عالی میناب، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

۲- بخش زیست مولکولی دانشکده زیست شناسی دانشگاه دولتی بلاروس

hossein.pasalari@hormozgan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۵، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۱۹

صفحه ۱۸-۱۳

چکیده

تیمار گیاهان با علف کش گلایفوسیت می تواند بر روی مقاومت آنها به بیماری تأثیر بگذارد. تأثیر گلایفوسیت در تغییر بیان چند ژن مرتبط با بیماری زایی و مقاومت در گیاه سیب زمینی تراریخته آلوده شده با دو سویه بیمارگر بادزدگی *Phytophthora infestans* بررسی شد. برای این کار علف کش گلایفوسیت در غلظت بهینه ۱/۸ میلی گرم در لیتر بر روی سیب زمینی تراریخته، رقم Vesnianka استفاده شد. در برگ های سیب زمینی مایه زنی شده با بیمارگر و تیمار شده با گلایفوسیت، سطح بالایی از نسخه برداری ژن های مرتبط با بیماری زایی (به ویژه PR-2) و پاسخ دفاعی (به ویژه HSR-203j) مشاهده شد. در این گیاهان، علائم سوختگی و آلودگی در برگ های سیب زمینی مشاهده نشد. نتایج نشان داد که تیمار با گلایفوسیت، توانست با بیان ژن های رمزکننده پروتئین های درگیر در پاسخ دفاعی به القای مقاومت سیب زمینی به بیمارگر *P. infestans* کمک کند.

واژه های کلیدی: مقاومت، پاسخ دفاعی، ژن های وابسته به بیماری زایی، کمیت سنجی نسبی.

مقدمه

بیماری قارچی سفیدک داخلی سیب‌زمینی (بازدگی سیب‌زمینی) ناشی از *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary به عنوان مخرب‌ترین و مهم‌ترین بیماری سیب‌زمینی در دنیا قلمداد می‌شود. این بیمارگر قادر است هم به غده و هم به شاخ و برگ گیاه طی چندین مرحله از رشد گیاه حمله کند (Tratsiakova, 2011). استفاده گسترده از گلایفوسیت (N- فسفونومتیل گلیسین) از دهه ۱۹۹۰، تا حد زیادی نتیجه توسعه ارقام اصلاح‌شده و مقاوم در برابر این علف‌کش در برخی محصولات مهم است (Pasalari and Yevtushenkov, 2016).

مطالعات اخیر نشان داده است که گیاهان پس از تیمار با گلایفوسیت می‌توانند مقاومت به بیمارگرهای گیاهی را به دست آورند، چراکه این علف‌کش در اندام‌های رویشی، که برای ریزجانداران سمی است، تجمع می‌یابد. علف‌کش گلایفوسیت برای قارچ‌ها سمی بوده و می‌تواند مانع از خسارت برخی بیماری‌های قارچی شود و مصرف قارچ‌کش‌ها را کاهش دهد (Pontier et al, 1998).

تیمار گیاهان با گلایفوسیت می‌تواند باعث بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی در گیاهان شود

(Pasalari and Yevtushenkov, 2016).

پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (pathogenesis related proteins)، در پاسخ به تنش و آلودگی با بیمارگرها بیان می‌شوند و در تشکیل مقاومت اکتسابی سیستمیک در گیاهان نقش دارند. مقاومت در برابر یک بیمارگر به بیان ژن‌های مکمل در برهمکنش فعال گیاه-بیمارگر از جمله ژن‌های مقاومت مرتبط است (Gholamnejad, 2017).

پاسالاری و یوتوشنکوف (Pasalari and Yevtushenkov, 2016) نشان دادند که مقاومت تحت تأثیر مصرف گلایفوسیت در هنگام آلوده‌شدن گیاه سیب‌زمینی به وسیله باکتری‌های بیمارگر می‌تواند با القای ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و ژن‌های پاسخ دفاعی سیب‌زمینی ایجاد شود. در پژوهش حاضر تغییرات نسخه‌برداری برخی از ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و مقاومت در گیاه سیب‌زمینی در برهمکنش با بیمارگر بازدگی سیب‌زمینی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی زیست مولکولی گیاهی دانشگاه دولتی بلاروس (plant biomolecular research lab, Belarusian state

"پاسالاری، تأثیر علف‌کش گلایفوسیت در بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و مقاومت در ..."

نوری ۱۶ ساعته و دمای ۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

بعد از گذشت ۳ روز، از برگ‌های آلوده شده با قارچ و تیمار شده و تیمار نشده با گلایفوسیت نمونه‌برداری شد. استخراج آر.ان.ای کل با استفاده از کیت NucleoSpin RNA Plant kit (Macherey-Nagel, Germany) مطابق

دستورالعمل ارائه شده در آن انجام گرفت. زنجیره اول cDNA برای هر نمونه با استفاده از ۰/۵ میکروگرم آر.ان.ای کل و با استفاده از کیت First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Canada) سنتز شد. تغییرات سطح نسخه‌برداری چند ژن مرتبط با بیماری‌زایی و مقاومت (شامل ژن‌های *PR-2*، *PR-3*، *PR-5*، *aroA*، *HSR-203j* و *HIN1*) با استفاده از واکنش PCR Real Time (Q-RT-PCR) کمیت‌سنجی نسبی شد. آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های هدف و اندوژن رمزکننده فاکتور تداوم ترجمه ($EF1-\alpha$) در جدول ۱ آورده شده است. مقدار نسبی تعداد نسخه mRNA با فرمول $N(mRNA) = 2^{(\Delta Ct - \min(\Delta Ct))}$ محاسبه و تعیین شد (Livak and Schmittgen, 2001). مقایسه آماری میانگین سطح نسخه‌برداری به کمک آزمون دانکن در سطح ۵ درصد با کمک نرم‌افزار Excel انجام شد.

انجام شد. برای آزمایشات برهمکنش، از سیب‌زمینی رقم و سنجانکا (Tratsiakova, 2011; Pasalari and (Vesnianka Evtushenkov, 2016) که با انتقال ژن موتانت *aroA*، به عنوان یک ژن مقاوم به علف‌کش و بیمارگرها، تراریخته شده بود، استفاده شد (Pasalari et al, 2015).

برای مایه‌زنی گیاهان سیب‌زمینی، از دو سویه قارچ *P. infestans* (Ka2 و A1)، جداسازی شده از مزارع سیب‌زمینی اطراف شهر کالینکویچ (Kalenkovich) در استان گومل بلاروس (Gomele province, Belarus) استفاده شد. سویه‌های قارچی در محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-مایع (PDB) به مدت دو هفته در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه رشد داده شدند. سوسپانسیونی با غلظت حدود 2×10^7 زادمایه در میلی‌لیتر (CFU/mL) در محلول فیزیولوژیکی کلرید سدیم تهیه شد.

برای مایه‌زنی، ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون فوق روی هر برگ گیاهچه‌های دوماهه سیب‌زمینی که به وسیله تیغ اسکالپل زخم شده بود، قرار داده شد (سه تکرار). بعد از ۳ روز، گیاهچه‌ها با گلایفوسیت در غلظت ۱/۸ میلی گرم در لیتر اسپری شده و در اتاقک رشد تحت یک دوره

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش

Primers	Sequence	Amplicon size (bp)
Aseq2-f	CAGGAAACAGCTATGACGCATTAAAGGCGATCTGGTTTC	250, 750
aroA r_ch	TCAGAGCTCAGCCGTGCTGACTCAGA	
nt CTP-f	GTTTCTAGAAAAATGGCACAGATTAGCAGCATG	200-250
nt CTP-r	CAATGAGCTCCATGGTCTGTGCAAGTGACCACTGAT	
St PR2-f	CTAATGCGGTGGTACAAGATGG	250-300
St PR2-r	TGACACAACAATTCTACAGATCC	
St PR3-f	ATAAGCCATCATGCCACAACG	200-250
St PR3-r	GCAGTATTCGGACCCATCC	
St PR5-f	ATCTCCCGTCTCGCATTTGC	200-250
St PR5-r	GGGCCAAACTTGGAACCTTAATG	
St HSR-203j-f	GTAATGATAGTTTCGGTTGATAAGC	200
St HSR-203j-r	AGAGGTAGGAAGACGGAAAC	
St HIN-1f	GCAACTGCATTTTCCAAATCATC	200
St HIN-1r	CACGTAGAAATTGACCTTGTTAGG	
St EF1-α f	TTGATGCTCTTGACCAGATTAACG	250-300
St EF1- α r	ACGGGCACAGTTCCAATACC	

نتایج و بحث

سویه‌های قارچ *P. infestans* آلوده و سپس با

علامه بیماری در برگ‌های سیب‌زمینی که با

گلایفوسیت تیمار شدند، مشاهده نشد (شکل ۱).



P. infestans Ka2

شکل ۱- برگ سیب‌زمینی تیمار شده با گلایفوسیت و آلوده شده با سویه *P. infestans* Ka2 قارچ

(۱- ظرف سمت چپ): برگ سیب‌زمینی تیمار شده و آلوده شده با سویه *P. infestans* Ka2 قارچ (۱- ظرف سمت راست):

برگ تیمار نشده و آلوده شده با سویه *P. infestans* Ka2 قارچ

تیمار شده با گلایفوسیت نسبت به گیاهان شاهد که

مقایسه سطوح نسخه‌برداری ژن‌ها، سطح بالایی

با گلایفوسیت تیمار نشده بودند، نشان داد

از بیان ژن‌های *PR-2* و *HSR-203j* را در

(جدول ۲).

نمونه‌های آلوده شده با سویه‌های قارچی و

"پاسالاری، تأثیر علف‌کش گلایفوسیت در بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و مقاومت در ..."

جدول ۲- مقایسه میانگین سطح نسخه‌برداری ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و پاسخ دفاعی سیب‌زمینی آلوده‌شده با *P. infestans* و تیمارشده با گلایفوسیت.

Genes	Relative number of mRNA copies			
	Strain Ka2 (control)	Strain Ka2+glyphosate	Strain A1+glyphosate	Strain A1 (control)
<i>PR-2</i>	12,75 ± 0,12	35,60 ± 4,21*	17,35 ± 6,23*	13,25 ± 0,33
<i>PR-3</i>	6,20 ± 1,01	14,15 ± 0,12*	13,71 ± 1,03*	7,07 ± 0,38
<i>PR-5</i>	5,30 ± 2,01	9,35 ± 2,01*	8,32 ± 1,26*	7,06 ± 0,80
<i>HIN1</i>	9,20 ± 0,13	15,07 ± 5,12*	13,45 ± 1,20*	6,91 ± 0,28
<i>HSR-203j</i>	10,08 ± 2,60	31,10 ± 2,15*	25,30 ± 2,53*	10,85 ± 0,82
<i>aroA</i>	5,70 ± 1,01	10,90 ± 1,10*	12,13 ± 2,47*	7,10 ± 1,02

* تفاوت معنی‌دار سطح نسخه‌برداری ژن‌ها در گیاهان تیمارشده با گلایفوسیت نسبت به شاهد را نشان می‌دهد (p<0.05).

می‌تواند با القای پروتئین‌ها و ژن‌های پاسخ دفاعی، نوعی مقاومت اکتسابی سیستمی نسبت به بیمارگرهای گیاهی، از جمله *P. infestans* که در این مطالعه بررسی شد، ایجاد کند.

سپاسگزاری

بر خود لازم می‌دانم از کلیه همکاران در آزمایشگاه زیست مولکولی دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دولتی بلاروس بخصوص استاد راهنمای بزرگوار پروفسور آناتولی نیکلایویچ یوتوشنکوف که در اجرای این تحقیق همکاری صمیمانه‌ای داشتند کمال تشکر و قدردانی داشته باشم.

نتایج نشان داد که بین میزان نسخه‌برداری ژن‌ها در نمونه‌های تیمارشده با گلایفوسیت و شاهد ارتباط معنی‌داری وجود دارد. تأثیر گلایفوسیت در افزایش بیان ژن‌های پاسخ دفاعی که منجر به القای مقاومت در برابر بیماری بادزدگی در سیب‌زمینی شد، با یافته‌های وان لون (Van Pline et al, 2011)، و پلینه و همکاران (Pontier et al, 1998) و پاسالاری و یوتوشنکوف (2002) در گیاه پنبه و با مطالعه‌ی پنتیر و همکاران (Pasalari and Evtushenkov, 2016) در سیب‌زمینی انطباق دارد. مطالعات موجود نشان می‌دهند که تیمار گیاهان با گلایفوسیت علاوه‌بر ریشه‌کن کردن علف‌های هرز در مزارع کشاورزی

References

فهرست منابع

- Gholamnejad J. 2017. Plants defense mechanisms against pathogens. Plant pathology science 6(2): 24-32.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ Method. Methods 25 (4): 402-408.
- Pasalari HM, Tratsiakova OM, Evtushenkov AN. 2015. Glyphosate tolerance transgenic potato plants containing aroA gene. Proceeding of Belarusian State University 10: 123-126 (In Russ.).
- Pasalari H, Yevtushenkov AN. 2016. Expression of protective response genes in transgenic potato leaves after glyphosate treatment. Bulletin of BSU 1: 31.
- Pline WA, Wilcut JW, Duke SO. 2002. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate resistant and non-glyphosate resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 506- 512.
- Pontier D, Tronchet M, Rogowsky P. 1998. Activation of *hsr203*, a plant gene expressed during incompatible plant- pathogen interactions is correlated with programmed cell death. Molecular Plant-Microbe Interactions 11: 544-554.
- Tratsiakova V. 2011. Temperature dependence of PR genes expression and potato tissues maceration by strains *Pectobacterium* and *Dickeya*. Youth and Progress of Biology. 2011. Abstracts book of the VII International Scientific Conference of Students and PhD Students, Minsk, Belarus, P. 141.
- Van Loon LC. 2011. Significance of inducible defense-related proteins infected plants. Annual Review of Phytopathology 2006: 135-162.

The Effect of Glyphosate on the Expression of Pathogenesis-related and Resistance Genes in Transgenic Potato Infected with Late Blight Pathogen

Hossein Pasalari^{1*}, Anatooli Nikolaevich Evtushenkov²

1- Assistant Professor of Agriculture Department, Production engineering and plant breeding Group, Minab Higher Education Center, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

2- Department of Molecular Biology, Faculty of Biology, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus.

hossein.pasalari@hormozgan.ac.ir

Abstract

The treatment of plants by herbicide glyphosate can affect their resistance to disease. The effect of glyphosate on the expression of pathogenesis-related and resistance genes in transgenic potato infected with two strains of late blight pathogen, *Phytophthora infestans* was investigated. To do so, an optimal concentration of glyphosate (1.8 mg/L) were been used on transgenic potato, Vesnianka cultivar. a high level of expression of pathogenesis-related genes (especially *PR-2*) and defense response genes (especially *HSR-203j*). In these plants, no signs of burn and infection were observed were observed in the potato leaves infected with pathogen, and treated by glyphosate. The results showed that treatment by glyphosate could help to induce the resistance to *P. infestans* by expressing genes encoding defense response proteins.

Keywords: Resistance, Defense Response, Pathogenesis-related Genes, Relative Quantification.