مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۴، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰

ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

تأثیر علف‌کش گلایفوسیت در بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و مقاومت در گیاهان سیب‌زمینی تراریخته آلوده‌شده با بیمارگر بادزدگی سیب‌زمینی

20.1001.1.27170632.1400.14.1.2.9

حسین پاسالاری*[۱]، آناتولی نیکلایویچ 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 زیست‌شناسی 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 علف‌کش گلایفوسیت می‌تواند بر روی مقاومت آنها به بیماری تأثیر بگذارد. تأثیر گلایفوسیت در تغییر بیان چند ژن مرتبط با بیماری‌زایی و مقاومت در گیاه سیب‌زمینی تراریخته آلوده‌شده با دو سویه بیمارگر بادزدگی *Phytophthora infestans*، بررسی شد. برای این کار علف‌کش گلایفوسیت در غلظت بهینه ۱/۸ میلی‌گرم در لیتر بر روی سیب‌زمینی تراریخته، رقم Vesnianka استفاده شد. در برگ‌های سیب‌زمینی مایه‌زنی‌شده با بیمارگر و تیمارشده با گلایفوسیت، سطح بالایی از نسخه‌برداری ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی (به‌ویژه *PR-2*) و پاسخ دفاعی (به‌ویژه *HSR-203j*) مشاهده شد. در این گیاهان، علایم سوختگی و آلودگی در برگ‌های سیب‌زمینی مشاهده نشد. نتایج نشان داد که تیمار با گلایفوسیت، توانست با بیان ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های درگیر در پاسخ دفاعی به القای مقاومت سیب‌زمینی به بیمارگر *P. infestans* کمک کند.

واژه‌های کلیدی: مقاومت، پاسخ دفاعی، ژن‌های وابسته به بیماری‌زایی، کمیت‌سنجی نسبی.

مقدمه

بیماری قارچی سفیدک داخلی سیب‌زمینی (بادزدگی سیب‌زمینی) ناشی از *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary، به‌عنوان 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 Evtushenkov, 2016) نشان دادند که مقاومت تحت تأثیر مصرف گلایفوسیت در هنگام آلوده‌شدن گیاه سیب‌زمینی به‌وسیله 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 بادزدگی سیب‌زمینی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

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

university) انجام شد. برای آزمایشات برهمکنش، از سیب‌زمینی رقم وسنیانکا (Vesnianka) (Tratsiakova, 2011; Pasalari and Evtushenkov, 2016) که با انتقال ژن موتانت *aroA*، به‌عنوان 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)، جداسازی‌شده 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 ۲×۱۰^{۷} زادمایه در میلی‌لیتر (CFU/mL) در محلول فیزیولوژیکی کلریدسدیم تهیه شد.

برای مایه‌زنی، ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون فوق روی هر برگ گیاهچه‌های دوماهه سیب‌زمینی که به‌وسیله تیغ اسکالپل زخم شده بود، قرار داده شد (سه تکرار). بعد از ۳ روز، گیاهچه‌ها با گلایفوسیت در غلظت ۱/۸ میلی‌گرم در لیتر اسپری شده و در اتاقک رشد تحت یک دوره نوری ۱۶ ساعته و دمای ۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

بعد از گذشت ۳ روز، از برگ‌های آلوده‌شده با قارچ و تیمارشده 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 ارائه‌شده 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-α) در جدول ۱ آورده شده است. مقدار نسبی تعداد نسخه mRNA با فرمول $N(mRNA) = 2^{(\Delta Ct\text{-}min\ (\Delta Ct))}$ 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.

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	CAATGAGCTCCATGGTCTGTGCAGTGACCACTGAT	
St PR2-f	CTAATGCGGTGGTACAAGATGG	250-300
St PR2-r	TGACACAACAATTCCTACAGATCC	
St PR3-f	ATAAGCCATCATGCCACAACG	200-250
St PR3-r	GCAGTATTCGGACCCATCC	
St PR5-f	ATCTCCCGTCTCGCATTTGC	200-250
St PR5-r	GGGCCAAACTTGGAACCTTAATG	
St HSR-203j-f	GTAATGATAGTTCGGTTGATAAGC	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

علایم بیماری در برگ‌های سیب‌زمینی که با سویه‌های قارچ *P. infestans* آلوده و سپس با گلایفوسیت تیمار شدند، مشاهده نشد (شکل ۱).

P. infestans Ka2

شکل ۱- برگ سیب‌زمینی تیمارشده با گلایفوسیت و آلوده‌شده با سویه‌ی Ka2 قارچ *P. infestans*.

(۱- ظرف سمت چپ): برگ سیب‌زمینی تیمارشده و آلوده‌شده با سویه Ka2 قارچ *P. infestans*; (۱- ظرف سمت راست): برگ تیمارنشده و آلوده‌شده با سویه Ka2 قارچ *P. infestans*.

مقایسه سطوح نسخه‌برداری ژن‌ها، سطح بالایی از بیان ژن‌های *PR-2* و *HSR-203j* را در نمونه‌های آلوده‌شده با سویه‌های قارچی و تیمارشده با گلایفوسیت نسبت به گیاهان شاهد که با گلایفوسیت تیمارنشده بودند، نشان داد (جدول۲).

جدول۲- 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 Ka_2+glyphosate	Strain A1+glyphosate	Strain A1 (control)
PR-2	12,75 ± 0,12	35,60 ± 4,21*	17,35 ± 6,23*	13,25 ± 0,33
PR-3	6,20 ± 1,01	14,15 ± 0,12*	13,71 ± 1,03*	7,07 ± 0,38
PR-5	5,30 ± 2,01	9,35 ± 2,01*	8,32 ± 1,26*	7,06 ± 0,80
HIN1	9,20 ± 0,13	15,07 ± 5,12*	13,45 ± 1,20*	6,91 ± 0,28
HSR-203j	10,08 ± 2,60	31,10 ± 2,15*	25,30 ± 2,53*	10,85 ± 0,82
aroA	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 ($p<0.05$).

نتایج نشان داد که بین میزان نسخه‌برداری ژن‌ها در نمونه‌های تیمارشده با گلایفوسیت و شاهد ارتباط معنی‌داری وجود دارد. تأثیر گلایفوسیت درافزایش بیان ژن‌های پاسخ دفاعی که منجر به القای مقاومت در برابر بیماری بادزدگی در سیب¬زمینی شد، با یافته‌های وان لون (Van loon, 2011)، و پلینه و همکاران (Pline et al, 2002) در گیاه پنبه و با مطالعه‌ی پنتیر و همکاران (Pontier et al, 1998) و پاسالاری و یوتوشنکوف (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 می‌توانند 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.

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-ΔΔCt 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 Evtushenkov[2]

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.