

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

حسین پاسالاری^{*}، 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 تیمار شده با گلایفوسیت، سطح بالایی از نسخه‌برداری ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی (به‌ویژه PR-2) و پاسخ دفاعی (به‌ویژه HSR-203j) مشاهده شد. در این گیاهان، علائم 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 Yevtushenkov, 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

"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 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 *HINI*) 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 سنیانکا (Tratsiakova, 2011; Pasalari and (Vesnianka) 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 2×10^7 زادمایه در میلی‌لیتر (CFU/mL) در محلول فیزیولوژیکی کلریدسدیم تهیه شد.

برای مایه‌زنی، ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون فوق روی هر برگ گیاهچه‌های دو ماهه 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

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش

Primers	Sequence	Amplicon size (bp)
Aseq2-f	CAGGAAACAGCTATGACGCATTAAGGCGATCTGGTTTC	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	GTAATGATAGTTCCGGTTGATAAGC	200
St HSR-203j-r	AGAGGTAGGAAGACGGAAAC	
St HIN-1f	GCAACTGCATTTCCAAATCATC	200
St HIN-1r	CACGTAGAAATTGACCTTGTTAGG	
St EF1- α f	TGATGCTCTTGACCAGATTAACG	250-300
St EF1- α r	ACGGGCACAGTTCCAATACC	

نتایج و بحث

سویه‌های قارچ *P. infestans* آلوده و سپس با

علائم 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- طرف سمت چپ): برگ سیب‌زمینی تیمار شده و آلوده شده با سویه *P. infestans* Ka2 قارچ (۱- طرف 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 نسخه برداری 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 علف کش گلایفوسیت در بیان ژن های مرتبط با بیماری زایی و مقاومت در ..."

جدول ۲- مقایسه میانگین سطح نسخه برداری ژن های مرتبط با بیماری زایی و پاسخ دفاعی سیب زمینی آلوده شده با *P. infestans* و تیمار شده 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 معنی دار سطح نسخه برداری ژن ها در گیاهان تیمار شده با گلایفوسیت نسبت به شاهد را نشان می دهد (p<0.05).

می تواند با القای پروتئین ها و ژن های 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 می دانم از کلیه همکاران در آزمایشگاه زیست مولکولی دانشکده زیست شناسی دانشگاه دولتی بلاروس بخصوص استاد راهنمای بزرگوار پروفسور آناتولی نیکلایویچ یوتوشنکوف که در اجرای این تحقیق همکاری صمیمانه ای داشتند کمال تشکر و قدردانی داشته باشم.

نتایج نشان داد که بین میزان نسخه برداری ژن ها در نمونه های تیمار شده با گلایفوسیت و شاهد ارتباط معنی داری وجود دارد. تأثیر گلایفوسیت در افزایش بیان ژن های پاسخ دفاعی که منجر به القای مقاومت در برابر بیماری بادزدگی در سیب زمینی شد، با یافته های 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 مطالعه ی پنتیر و همکاران (Pasalari and Evtushenkov, 2016) در سیب زمینی انطباق دارد. مطالعات موجود نشان می دهند که تیمار گیاهان با گلایفوسیت علاوه بر ریشه کن کردن علف های 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.