

بیوتکنولوژی مدیریت نماتدهای انگل گیاهی

Biotechnology for control of Plant Parasitic Nematodes

شلاله مصلحی

Shalaleh Moslehi

استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan
Shahid Madani University, Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sh.moslehi@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱)

چکیده

نماتدهای انگل گیاهی جزو پاتوژنهایی محسوب می شوند که خسارت اقتصادی فراوانی به محصولات کشاورزی وارد می کنند. استفاده از ارقام مقاوم، تناوب زراعی، کنترل شیمیایی، موجودات آنتاگونیست و کنترل زیستی از اصلی ترین روش های کنترل نماتدها هستند. ژن های طبیعی مقاومت به نماتدها در ژنوم گونه های گیاهی و امکان انتقال این ژن ها به ارقام زراعی که فاقد چنین مقاومتی هستند بسیار حائز اهمیت است. زیست فناوری از طریق انتخاب بر پایه نشانگرها می تواند در ردیابی بهترین ژن های مقاومت به نماتدها و ارائه اطلاعات مفید مربوط به آن ها از لحاظ پ

مقدمه

آگاهی در مورد برهم کنش های مولکولی نماتد-میزبان سبب پیشرفت در روش های نوین کنترل نماتدها شده و می تواند به راهکارهای موفق رابطه انگلی نماتدها با میزبان غلبه کند. امروزه پیشرفت های علمی در دانشگاه ها چشمگیر بوده و پژوهش های با کیفیت بالا می تواند در فهم نحوه برهم کنش نماتد-گیاه مفید باشد. چنین پژوهش هایی می تواند منجر به شناسایی افکتورهایی شود که نماتدها برای چیره شدن بر دفاع گیاه میزبان ترشح می کنند. هم چنین در مورد سازوکار حرکت نماتد در ریشه و در مورد برخی گونه ها اطلاعاتی در مورد مکان های تغذیه ای اختصاصی در اختیار پژوهشگر قرار دهد (جدول ۱). اما هنوز فاصله زیادی بین این اطلاعات پایه و کاربرد این روش ها در کنترل نماتدها وجود دارد. بنابراین نماتدشناسان باید دنبال ارائه راهکارهای کاربردی برای کشاورزان و تلفیق مدیریت سنتی و نوین علیه نماتدهای انگل گیاهی باشند (Scoabar and Fennol 2015). اولین گزارش ها از انتخاب گیاهان حساس و مقاوم به نماتدها به اواخر قرن نوزدهم برمی گردد که انتخاب فنوتیپی (تعداد گره در ریشه) مبنای انتخاب گیاهان حساس و مقاوم به نماتد گره ریشه بود. پس از آن مقاومت برخی ارقام گیاهانی چون لوبیا چشم بلبلی، چغندر قند، پنبه و قهوه نیز در برابر نماتدهای گره ریشه بررسی شد (Wilfarth 1900؛ Webber and Orton 1902). امروزه با آگاهی بیشتر در مورد برهم کنش های نماتد-گیاه، مشخص شده است که گیاهانی که اجازه تولید مثل به نماتدها را می دهند با نماتدها رابطه سازگار دارند اما در رابطه ناسازگار بین گیاه میزبان و نماتد، گیاه در برابر نماتد مقاومت نشان می دهد. در هنگام اعمال روش های کنترل، هدف کاهش تولید مثل نماتد و در نتیجه کاهش سطح آلودگی است. برخی از راهکارهای مبتنی بر زیست فناوری در کنترل نماتدهای انگ

نماتدهای انگل گیاهی اساس و پایه اصلاح گیاهان است. از آنجایی که نماتدهای مولد سیست و گره ریشه در سراسر دنیا خسارات شدیدی به محصولات مهم کشاورزی وارد می‌کنند، تلاش‌های زیادی در زمینه شناسایی منابع مقاومت در برابر گونه‌ها و تیپ‌های انگلی این نماتدها انجام شده است (جدول ۲).

ژنی مربوط به صفات کمی (QTLs)، همسانه‌سازی موقعیتی و خالص‌سازی و تعیین ویژگی ژن‌های مسئول در بروز مقاومت است. روش‌های مولکولی به‌کار رفته در نقشه‌برداری از جمعیت‌ها شامل روش‌های مبتنی بر RFLP، AFLP، RAPD، SCAR، STS و برخی روش‌های نوین دیگر است. انتخاب بر مبنای نشانگر در مورد مقاومت به

جدول ۱- راهکارهای مبتنی بر زیست‌فناوری در کنترل نماتدهای انگل گیاهی (برگرفته از Fosu-Nyarko and Jones 2015)

Table 1- Biotechnology-based strategies for nematode control (Fosu-Nyarko and Jones 2015)

هدف مورد استفاده در کنترل	ملاحظات	پیشرفت‌ها، موفقیت‌ها یا مثال‌های مهم
ژن‌های مقاومت جزئی و کامل	انتقال ژن‌های مقاومت طبیعی از گونه‌های وحشی و نزدیک، اساس راهکارهای اصلاح است.	- اصلاح بر پایه نشانگرها برای ایجاد مقاومت علیه نماتدها - ژن‌های موثر کافی برای تمام گیاهان هنوز یافت نشده است.
مهاجرت نماتد در ریزوسفر و ورود به ریشه	تخریب فعالیت‌های عصبی نماتد می‌تواند در این مورد اختلال ایجاد کند.	بهره‌گیری از پپتید

جدول ۲- برخی ژن‌های مقاومت طبیعی مهم گیاهان در برابر نماتدهای گره ریشه و سیست (برگرفته از Fosu-Nyarko and Jones 2015)

Table 2- Some natural resistance genes of plants against cyst and root knot nematodes (Fosu-Nyarko and Jones 2015)

منابع مهم	ژن‌های مقاومت (گیاه یا منبع مقاومت)	گونه‌های نماتد
Leister et al. 1996 Niewohner et al. 1995 Ganal et al. 1995	<i>Gro1</i> (سیب‌زمینی) <i>H1</i> (سیب‌زمینی) <i>Hero</i> (گوجه‌فرنگی)	<i>Globodera rostochiensis</i>
van der Voort et al. 1997	<i>Gpa2</i> (سیب‌زمینی)	<i>Globodera pallida</i>
Concibido et al. 2004	<i>Rhg4</i> , <i>Rhg1</i> (سویا)	<i>Heterodera glycines</i>
Lewis et al. 2009	<i>Ha4</i> , <i>Ha3</i> , <i>Ha2</i> (جو) <i>Cre8</i> , <i>Cre3</i> , <i>Cre1</i> (گندم)	<i>Heterodera avenae</i>
Heller et al. 1996	<i>Hs2</i> , <i>Hs1^{pro-1}</i> (چغندر قند)	<i>Heterodera schachtii</i>
Chu et al. 2011	<i>Rma</i> , <i>Mag</i> , <i>Mae</i> (بادام زمینی)	<i>Meloidogyne arenaria</i>
Djian-Caporalino et al. 2007	<i>Mi-9</i> , <i>Mi-3</i> , <i>Mi-1</</i>	

توانایی نماد را در ایجاد مکان‌های تغذیه‌ای مورد هدف قرار می‌دهد مطرح نمود. موفقیت چنین روش‌هایی به شناسایی پیش‌برهای گیاهی که به طور اختصاصی یا به فراوانی در مکان‌های تغذیه‌ای بیان می‌شوند بستگی دارد. این پیش‌برها می‌توانند به ژن‌های کشنده که هنگام بیان داخل سلول‌های تغذیه‌ای سبب مرگ یا ایجاد نقص در سلول می‌شوند متصل شوند. اولین مثال از این راهکار چنین گزارش شد که پیش‌بر کوتاه شده پروتئین کانال آبی (TobRB7) به طور اختصاصی در داخل سلول‌های غول‌آسای اختصاصی نماد گره ریشه در گیاه بیان می‌شود و زمانی که به ریبونوکلوئاز کشنده سلول (Barnase) متصل می‌شود سبب مرگ سلول می‌گردد (Opperman et al. 1994). اما بیان ناخواسته چنین ژن کشنده‌ای در سایر سلول‌های گیاهی می‌تواند یک ایراد جدی برای این راهکار باشد که با برخی روش‌ها اصلاح می‌شود. اگرچه گروهی از ژن‌ها شناسایی شده‌اند که در سلول‌های تغذیه‌ای نمادها بیانشان کم یا زیاد می‌شود اما باید پیش‌برهایی استفاده گردد تا علاوه بر بیان بالا در مکان‌های تغذیه‌ای، بدون ایجاد عوارض جانبی ناخواسته برای گیاهان عمل نماید.

با پیشرفت در زمینه فناوری، تجزیه و تحلیل تغییرات الگوی بیان ژن‌ها در سلول‌های تغذیه‌ای نمادها با جزئیات کامل ممکن شده است. بسیاری از این پژوهش‌ها به خاطر اهمیت اقتصادی بالای آن به کار روی سلول‌های تغذیه‌ای نماد سیستم سویا متمرکز شده است. با به‌کارگیری ریزآرایه‌ها، ۱۰۰ ژن منتخب سویا که در سلول‌های تغذیه‌ای بیان تغییر یافته و متفاوتی دارند شناسایی شده‌اند. بعضی از این ژن‌ها با افزایش بیان سبب کاهش ۵۰ درصدی در تعداد افراد ماده گردیدند و برخی اثر عکس داشتند. بنابراین چالش بعدی، انتخاب ژن‌هایی است که سبب ایجاد مقاومت در گیاه شده و فقط در تشکیل سلول‌های تغذیه‌ای اختلال

</

توضیح این روش‌ها در این نوشتار نمی‌گنجد اما این روش‌های پیشرفته ویرایش ژن می‌توانند برای دستکاری ژن‌های گیاه میزبان مثلاً از طریق تخریب یا تغییر بیان ژن‌های اساسی در تشکیل مکان‌های تغذیه‌ای نماتدهای انگل داخلی ساکن به کار روند. با این حال، هنوز در مورد عدم وجود اثرات جانبی ناخواسته برای این فناوری‌ها اطمینان کافی وجود ندارد.

استفاده از محصولات دارای مقاومت به نماتدها از مرحله آزمایش تا تجاری‌سازی

پس از انجام پژوهش‌ها و گرفتن نتیجه رضایت بخش از آزمایش‌های مختلف، قدم‌های بعدی باید برداشته شود. قبل از این که مقاومت به نماتد یا ویژگی دیگری بتواند تجاری شود علاوه بر اینکه بازارپسندی و صرفه اقتصادی آن بررسی می‌شود باید ثبت اختراع شود. در سطح دانشگاهی، این کار معمولاً از طریق ثبت موقت در دفاتر دانشگاهی انجام می‌گیرد. سپس مراحل بعدی جهت ثبت کامل محصول پژوهش انجام خواهد گرفت. این مراحل از طریق برخی شرکت‌های خصوصی نیز قابل انجام است. در کل این فرایندها میزان هزینه مورد نیاز برای تجاری‌سازی محصول برآورد شده و با شرکت یا شرکت‌هایی که بتوانند این هزینه‌ها را تقبل کنند مذاکره انجام می‌شود. به طور کلی، کل فرایند تجاری‌سازی یک محصول جدید مقاوم به نماتد را به طور خلاصه چنین می‌توان توصیف کرد: مرحله کشف و شناسایی ژن مقاومت یا عامل مقاومت که شامل انواع روش‌های غربال و آزمون بر روی گیاهان مدل است. پیش‌روی و توسعه کار شامل چندین مرحله است که مهمترین آن انجام بهینه‌سازی ژن و وارد کردن آن به گیاه و انجام تمام آزمایش‌های تکمیلی مربوط به آن می‌باشد تا نتیجه مطلوب از هدف مورد نظر به دست آمده و تایید شود.

ایجاد کرده و تغییر دیگری در متابولیسم و حالت طبیعی رشد گیاه ایجاد نکند.

جدول ۳- RNAi راه اندازی شده در گیاه در مورد برخی ژن های اساسی و انگلی نماتدهای گره ریشه (برگرفته از Fosu-Nyarko and Jones 2015)

Table 3- Host-delivered RNAi for parasitism and essential genes of root knot nematodes (Fosu-Nyarko and Jones 2015)

گونه نماتد	ژن خاموش شده (گیاه محصول)	فتوتیپ به دست آمده	منبع
<i>M. incognita</i>	<i>Snfc-5</i> (تنباکو)	کاهش ۹۰ درصدی نماتدها	Yadav et al. 2006
	<i>(prp-21)</i> فاکتور ویرایش پیش - mRNA (تنباکو)	کاهش ۹۰ درصدی نماتدها	
	<i>(16D10)</i> پپتید ترشچی (آرابیدوپسیس)	کاهش ۸۳-۶۹ درصدی تعداد تخم در گره ریشه و بیش از ۶۳ درصد کاهش در اندازه و تعداد گره ها	Huang et al. 2006
	<i>(tnc)</i> ، تروپونین C (گوجه فرنگی)	کاهش ۵۹ درصدی در تفریخ لارو سن دوم	Dubreuil et al. 2009
	<i>(16D10)</i> پپتید ترشچی (انگور)	کاهش کلی تعداد تخم ها در هر گرم از ریشه	Yang et al. 2013
	<i>(ctr)</i> کالرتیکولین (گوجه فرنگی)	کاهش ۸۴ درصدی در گره های ایجاد شده از لاروهای سن دوم حاصل از خاموشی	

جدول ۴- RNAi راه اندازی شده در گیاه در مورد برخی ژن های اساسی و انگلی نماتدهای سیست (برگرفته از Fosu-Nyarko and Jones 2015)

Table 4- Host-delivered RNAi for parasitism and essential genes of cyst nematodes (Fosu-Nyarko and Jones 2015)

منبع	فئوتیپ ایجاد شده	ژن خاموش شده و گیاه محصول	گونه نماتد
Steeves et al. 2006	بیش از ۶۸ درصد کاهش در تعداد سیست ها	(MSP) پروتئین بزرگ اسپرم (سویا)	<i>Heterodera glycines</i>
Klink et al. 2009	۸۷ درصد کاهش در تعداد سیست ها	(rps-3a) پروتئین ریبوزومی 3a (سویا)	
Klink et al. 2009	۸۱ درصد کاهش در تعداد سیست ها	(rps-4)، پروتئین ریبوزومی ۴ (سویا)	
Klink et al. 2009	۸۸ درصد کاهش در تعداد سیست ها	(spk-1)، پروتئین SR (سویا)	
Klink et al. 2009	۹۳ درصد کاهش در تعداد سیست ها	(snb-1) سیناپتوبروین (سویا)	
Li et al. 2010	۸۱ درصد کاهش در تعداد سیست ها	(Y25) زیر واحد بتا از کمپلکس COPI (سویا)	
Li et al. 2010	۷۹ درصد کاهش در تعداد نماتدها	(prp-17) فاکتور ویرایش پیش mRNA (سویا)	
Li et al. 2010			

جمع‌بندی نهایی

بهره‌برداری از ژن‌های مقاومت طبیعی با استفاده از غربال ژنوتیپ‌ها و انتخاب با نشانگرها، به روشی استاندارد برای بهبود مقاومت یا تحمل به نماتدها در بسیاری از محصولات گیاهی تبدیل شده است. با این وجود، در مورد بسیاری از محصولات، این رویکرد بسیار کند بوده و در خیلی از موارد، مقاومت با طیف وسیع ایجاد نمی‌شود. این یکی از دلایل عقب‌ماندگی به کارگیری زیست‌فناوری در ایجاد گیاهانی با ویژگی مقاومت به نماتدها در مقایسه با گیاهانی است که سایر ویژگی‌های زراعی در آن‌ها اصلاح می‌شود. اما با پیشرفت در زمینه‌های زیست‌فناوری، ایجاد ارقام تجاری از محصولات اقتصادی مهم که با روش‌های تراریخته مقاوم شده‌اند رو به افزایش خواهد بود. مثلاً ذرت تراریخته متحمل به علف‌کش‌ها و مقاوم به حشره‌ها در بازار موجود است و چنین ارقامی با مقاومت مشابه در سویا، پنبه و سایر محصولات نیز در حال ایجاد هستند. چنین رویکردهایی از طریق فناوری‌هایی چون RNAi یا بیان ژن‌های مقاومت و ... می‌تواند سبب ایجاد گیاهان مقاوم به نماتد

نیز گردد. علاوه بر این، ژن‌های مقاومت مصنوعی با محل‌های اثر مختلف، می‌توانند برای افزایش کارایی و ماندگاری ویژگی مقاومت به نماتد به کار روند و یا بیان ژن‌های وارد شده را محدود به ریشه‌ها کنند. با این حال بررسی‌ها در مورد امنیت این محصولات برای تغذیه بشر و محیط زیست باید ادامه داشته باشد. دو سوم جمعیت جهان در کشورهایی زندگی می‌کنند که در آن‌ها محصولات دستکاری شده کشت می‌شود و توجه به تامین غذای این جمعیت اهمیت زیادی دارد. بنابراین چنین احتمال می‌رود که استفاده از محصولات تراریخته به عنوان یکی از روش‌های تامین غذای این جمعیت رو به رشد، پس از این بیشتر مورد قبول واقع شده و افزایش یابد. موفقیت‌های فراوانی در زمینه به کارگیری زیست‌فناوری در ایجاد ارقام گیاهی مقاوم به نماتدها انجام گرفته است و هنوز هم پژوهش‌های جدیدتر

- against *Globodera rostochiensis* in tomato. *Molecular Plant Microbe Interactions* 8: 886–891.
- Hamamouch N, Li C, Hewezi T, Baum TJ, Mitchum MG, Hussey RS, Vodkin LO, Davis EL. 2012.** The interaction of the novel 30C02 cyst nematode effector protein with a plant beta-1,3 endoglucanase may suppress host defence to promote parasitism. *Journal of Experimental Botany* 63: 3683–3695.
- Heller R, Schondelmaier J, Steinrucken G, Jung C. 1996.** Genetic localization of four genes for nematode (*Heterodera schachtii* Schm.) resistance in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 92:991–997.
- Huang G, Allen R, Davis EL, Baum JT, Hussey SR. 2006.** Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proceedings of National Academy of Science of the USA* 103: 14302–14306.
- Ibrahim HMM, Hosseini P, Alkharouf NW, Hussein EHA, El Kader A, El-Din G, et al. 2011.** Analysis of gene expression in soybean (*Glycine max*) roots in response to the root knot nematode *Meloidogyne incognita* using microarrays and KEGG pathways. *BMC Genomics* 12: 220.
- Klink VP, Kim KH, Martins V, Macdonald MH, Beard HS, Alkharouf NW, et al. 2009.** A correlation between host-mediated expression of parasite genes as tandem inverted repeats and abrogation of development of female *Heterodera glycines* cyst formation during infection of *Glycine max*. *Planta* 230: 53–71.
- Leister D, Ballvora A, Salamini F, Gebhardt C. 1996.** A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genetics*

- Webber HJ, Orton WA. 1902.** Some diseases of cowpea. II. A cowpea resistant to root knot nematode. In USDA bureau of plant industry Bulletin no. 17.
- Wilfarth H. 1900.** Ein neuer gesichtspunkt zur bekämpfung der nematoden. Zeitchr. d. verd Deut. Zucker Industrie. Lieferung 529: 195–204.
- Williams, KJ. Fisher JM, Langridge P. 1996.** Development of a PCR-based allele specific assay from an RFLP probe linked to resistance to cereal cyst nematode in wheat. Genome 39:798–801.
- Williams K, Taylor S, Bogacki P, Pallotta M, Bariana H, Wallwork H. 2002.** Mapping of the root lesion nematode (*Pratylenchus neglectus*) resistance gene Rlnn1 in wheat. Theoretical and Applied Genetics 104: 874–879.
- Yadav BC, Veluthambi K, Subramaniam K. 2006.** Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. Molecular and Biochemical Parasitology 148: 219–222.

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Volume 7, Number 2

Biotechnology for control of Plant Parasitic Nematodes

Shalaleh Moslehi

Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran Email Corresponding author: sh.moslehi@yahoo.com

Abstract

Plant parasitic nematodes are amongst the most economically important groups of pathogens. The use of resistant cultivar, crop rotation, chemical control, antagonistic organisms and biocontrol agents are the principal methods for management of the nematodes. Natural nematode resistance genes present in gene pools of crop species and their relatives have been used with the aim of transferring such traits into economically important plants where effective resistance is lacking. Biotechnology contributes to this process via marker-assisted selection to identify the best nematode resistance genes, and increasingly in providing new knowledge of target genes, and the potential to exploit this knowledge using transgenic technology. Thus recent advances make it possible to exploit specific aspects of nematode-host plant interactions to design control strategies that include enabling plants to prevent nematode invasion, migration through tissues and reducing feeding ability or nematode fecundity. Application of RNAi, new biotechnology-based chemical nematicides and some other methods are amongst the modern strategies of control. New traits would be added to existing crop genotypes with the best conventional or natural nematode resistance to increase the effectiveness and durability of the nematode resistance trait. Biotech trait expression could also be limited to roots to minimize expression in harvested parts.

Key words: Biological control, Integrated management, Pathogen, Resistance, Transgenic.