شناسایی برخی افکتورهای مرتبط با بیماری‌زایی در نماتد سیستی کلم، *Heterodera cruciferae, Franklin, 1945*

حبیبه جباری[1*]، غلامرضا نیکنام[2]، زهرا تنهامعافی[3]، عبدالناصر العشری[4] و فلورین گراندلر[5]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲۴)

چکیده

نماتد سیستی کلم (*Heterodera cruciferae* Franklin, 1945) از جمله نماتدهایی است که احتمالاً به علت خسارت نسبتاً کم و پراکندگی محدود جغرافیایی، تحقیقات کم‌تری در مقایسه با سایر نماتدهای سیستی بر روی آن انجام شده است. تمامی اعضای خانواده کلم‌سانان (Brassicaceae) و برخی از گیاهان خانواده نعناعیان (Lamiaceae) توسط این نماتد آلوده می‌شوند. آلودگی به نماتد سیستی کلم در سبزی‌کاری‌های اطراف تبریز روی انواع کلم و هم‌چنین علف‌های هرز سلمه‌تره (*Chenopodoum album*)، شیرتیغی (*Sonchus asper*) و *Sisymbrium loeselii* مشاهده گردید. جمعیتی از این نماتد از مزارع آلوده جمع‌آوری و بر اساس صفات ریخت‌شناختی، ریخت‌سنجی و مولکولی شناسایی شد. تکثیر و نگهداری نماتدها روی میزبان اصلی آن در شرایط گلخانه صورت پذیرفت. استخراج RNA از نماتدها و واکاوی ترانسکریپتوم جمعیتی شامل مراحل لاروی سن سه، چهار و بالغ انجام گردید. نتایج نشان داد که بسیاری از ژن‌های بیماری‌زایی گزارش‌شده از سایر نماتدهای انگل گیاهی مانند نماتد طلایی سیب‌زمینی، نماتد سیستی چغندرقند، نماتد قلوه‌ای و نماتد چوب کاج، در نماتد سیستی کلم نیز بیان می‌گردند. ژن‌های بتا-۱،۴-اندوگلوکوناز (سلولاز)، ۳-۳-۱۴، گلوتاتیون پراکسیداز، پکتات لیاز، کیتیناز، major sperm protein، کالریتیکولین، کالمودولین، venum allergene like protein، ubiquitin extension protein، پراکسی‌ردوکسین، کوریسمات میوتاز، آلدولاز، آنکسین، گالکتین، VRFamid receptor و آرژینین کیناز در این نماتد شناسایی و در پایگاه اطلاعات داده‌ها (NCBI) ثبت گردید.

کلیدواژه: بیماریزایی، توالی‌یابی، ژن

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jabbari@maragheh.ac.ir و jabbari.habibeh@gmail.com

۱. استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.

۲. استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۳. استاد پژوهش بخش تحقیقات نماتدشناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران، ایران.

۴. استادیار، انستیتو مولکولار فیتومدیسین، دانشگاه بن، بن، آلمان.

۵. استاد، انستیتو مولکولار فیتومدیسین، دانشگاه بن، بن، آلمان.

Identification of some putative parasitism effectors of *Heterodera cruciferae*, Franklin, 1945 on cabbage

H. Jabbari[1*], G. Niknam[2], Z. Tanha Maafi[3], A. Elashry[4], and F.M.W. Grundler[5]

(Received: 8.4.2017; Accepted: 15.9.2017)

Abstract

Cabbage cyst nematode (*Heterodera cruciferae*, Franklin, 1945) is a nematode that probably due to less geographical distribution and relatively lower crop losses in comparison to related species has gained less attention. All members of Brassicaceae and some species of Lamiaceae are infected by the nematode. Cabbage cyst nematodes was observed in vegetable growing areas of suburb of Tabriz on cabbage and some weeds such as *Chenopodoum album*, *Sonchus asper* and *Sisymbrium loeselii* as well. A population of this nematode collected from the infected vegetable fields of Tabriz and its identity was confirmed based on morphological, morphometrical and molecular data. Propagation and maintainance of the nematode was carried out on its main host (white cabbage and kohlrabi) under greenhouse conditions. RNA was extracted from the nematode and transcriptome of the population including third, fourth stage juveniles and adult females analysed. The results revealed that most already reported parasitism genes from other plant parasitic nematodes such as potato cyst nematode, sugar beet cyst nematode, reniform nematode and pine wood nematode are expressed in cabbage cyst nematode, too. Furthermore, it was found that, β-1,4-endogluconase, 14-3-3, glutathione peroxidase, pectatelyase, chitinase, major sperm protein, calreticulin, calmodulin, venum allergen like protein, ubiquitin extension protein, peroxiredoxin, chorismate mutase, aldolase, annexin, galectin, VRFamid receptor and arginine kinase could be considered as a part of the nematode parasitism effectors. All sequences were deposited in NCBI.

Keywords: gene, pathogenicity, sequencing

*Corresponding author's E-mail: jabbari@maragheh.ac.ir , jabbari.habibeh@gmail.com

1. Assistance Professor, Department of Plant Protection, University of Maragheh, Maragheh, Iran.
2. Professor, Department of Plant Protection, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
3. Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran.
4. Associated Professor, Institute of Molecular Phytomedicine, INRES, University of Bonn, Bonn, Germany.
5. Professor, Institute of Molecular Phytomedicine, INRES, University of Bonn, Bonn, Germany.

مقدمه

نماتد سیستی کلم (*Heterodera cruciferae* Franklin, 1945) اولین بار در سال ۱۹٤٥ توسط فرانکلین (Franklin 1945) از روی ریشه‌های باقی‌مانده کلم‌برگ در مزرعه‌ای جمع‌آوری و توصیف گردید. این نماتد انگل داخلی ساکن بوده که دامنه میزبانی آن محدود به گیاهان خانواده‌های کلم‌سانان (Brassicaceae) و نعناعیان (Lamiaceae) می‌باشد (Subbotin *et al.* 2010). هر چند استون و راو (Stone & Rowe 1976) نماتد سیستی کلم را به خاطر خسارت نسبتاً کم آن در مقایسه با سایر نماتدهای سیستی، جزو گونه‌های مخرب قرار ندادند، اما خسارت حاصل از آن در مزارع کلم بروکلی کاشته‌شده در کالیفرنیا در حد زیاد گزارش شده است (Subbotin *et al.* 2010). در ایران این نماتد برای اولین بار از خاک مزارع چغندرقند مشهد شناسایی و گزارش گردید (Mahdikhani Moghadam 1998). آلودگی میزبان با نفوذ لاروهای سن دو به صورت داخل سلولی به درون ریشه صورت گرفته و تشکیل سلول‌های تغذیه‌ای خاص (syncytium) را موجب می‌گردد. تشکیل و تداوم این سلول‌های تغذیه‌ای برای موفقیت نماتد در ایجاد بیماری، بقاء و تولیدمثل آن ضروری است. تشکیل و نیز بقای سلول‌های تغذیه‌ای در اثر بیان ژن‌های مختلف از جمله ژن‌های دخیل در بیماری‌زایی صورت می‌گیرد. تولیدات حاصل از بیان این ژن‌ها یا افکتورها در بیشتر موارد از غدد مری نشأت گرفته و از راه مجرای استایلت نماتد وارد گیاه می‌شوند. بیشتر ترکیباتی که تا کنون در ارتباط با بیماری‌زایی نماتدها شناسایی گردیده، ماهیت پروتئینی دارند، هرچند در نماتدهای ریشه گرهی و سیستی، موادی شبیه هورمون‌های اکسین و سیتوکینین یافت شده است که در تغییر میزان این هورمون‌ها در گیاهان در طی بیماری‌زایی موثرند (Rosso & Grenier 2011). ژن‌های بیماری‌زایی نماتد می‌توانند در یک یا کلیه مراحل چرخه زندگی نماتد فعال باشند، هرچند برخی از آن‌ها تنها در مراحل قبل و یا حین آلوده‌سازی بیان می‌شوند (Davis *et al.* 2000).

مطالعات بسیاری روی ترشحات مری نماتدها با هدف شناسایی افکتورهای موثر در بیماری‌زایی صورت گرفته است. دخالت این مواد در ایجاد ساختارهای تغذیه‌ای، تخریب دیواره سلولی و تغییر مقاومت میزبان در برابر نماتدها به اثبات رسیده است. پس از شناسایی ژن بیماری‌زایی رمزکننده بتا-۱،٤-اندوگلوکاناز در دو نماتد سیستی *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) و *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952 (Behrens, 1975) و گروهی از ژن‌های بیماری‌زایی تجزیه کننده دیواره سلولی گیاهان شامل پکتینازها، گالاکتروزیدازها، زایلانازها و اکسپنسین‌ها در نماتدهای انگل ساکن و مهاجر شناسایی و گزارش شدند (Davis *et al.* 2009). آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی نماتدها در مقایسه با سایر افکتورها بیشتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند. آنزیم سلولاز یا بتا-۱،٤-اندوگلوکاناز که در تجزیه دیواره سلولی گیاه نقش دارد، اولین بار در نماتدهای سیستی سیب‌زمینی *G. rostochiensis* و نماتد سیستی سویا *H. glycines* شناسایی و گزارش گردید و این اولین گزارش از تولید این آنزیم در جانوران بود (Smant *et al.* 1998). افکتورهای بیماری‌زایی شناسایی‌شده در نماتدها در گروه‌های مختلف و با عملکردها و فعالیت‌های متفاوت قرار می‌گیرند برای مثال پروتئین‌های دخیل در تخریب دیواره سلولی (شامل بتا-۱،٤-اندوگلوکاناز، سایر گلوکونازهای هیدرولیتیک و اکسپنسین‌ها)، ترکیبات موثر در سوخت و ساز سلولی و جابجایی مواد در میزبان (شامل chorismate

mutase، annexin و calreticulin)، تغییر تنظیمات سلولی (مثل Ranbpm و ubiquitination/proteasome)، کاهنده واکنش‌های میزبان (از قبیل venom allergen proteins)، دفاع‌های سطحی، پیام‌های مخفی و پپتیدهای زیست‌فعال قابل ذکر می‌باشند (Davis *et al.* 2009). استفاده از ریزآرایه (Microarrey)، فن‌آوری خاموشی ژن به وسیله‌ی RNA مداخله‌گر (RNAi: RNA interference)، جداکردن و بررسی محل‌های تغذیه‌ای نماتد در گیاه، Next generation sequencing، AFLP (amplified fragment length polymorphism)، مطالعه تغییرات در پروتئوم گیاهانی که مورد حمله نماتدها واقع شده‌اند، از جمله روش‌هایی هستند که برای شناسایی افکتورهای بیماری-زایی نماتدها به‌کار رفته‌اند (Escobar *et al.* 2011).

با توجه به اهمیت شناسایی ژن‌های بیماریزایی در نماتدهای انگل گیاهی و عدم وجود تحقیقاتی در مورد توالی مرتبط با این ژن‌ها در مراحل مختلف زیستی نماتد سیستی کلم، *H. cruciferae*، بررسی حاضر صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه و شناسایی نماتد سیستی کلم

نماتد سیستی کلم مورد استفاده در این بررسی از سبزی‌کاری‌های اطراف تبریز واقع در حکم‌آباد (با مختصات"11.07 ´06 ° 38 N و "32 00 ´16 °46 E) از فراریشه چهار رقم کلم رایج در منطقه شامل دو رقم کلم-قمری *Brassica oleracea* L. var. *gongylodes* (با دوره رشدی شش‌ماه و سه‌ماه) و دو رقم کلم‌برگ *B. oleracea* L. var. *captita alba* (با دوره رشدی شش‌ماه و سه‌ماه) جداسازی شدند. جداسازی سیست‌ها با استفاده از روش شناورسازی ۲۰۰ گرم خاک در آب و یا استفاده از دستگاه فن‌ویک (Fenwick 1940) صورت گرفت. سیست‌ها پس از استخراج، زیر استرئومیکروسکپ با کمک قلم مو و یا پنس از بقایای خاک جداسازی و در لوله‌های اپندورف و یا ظروف پتری پلاستیکی با قطر سه سانتی‌متر و در دمای اتاق نگه‌داری گردید. شناسایی با استفاده از صفات ریخت‌شناختی، ریخت‌سنجی و مولکولی صورت گرفت (Franklin 1945؛ Stone & Rowe 1976؛ Subbotin *et al.* 2010). تکثیر و توالی‌یابی بخش‌های ITS1- ITS2 -5.8S از ژن ریبوزومی با کمک آغازگرهای اختصاصی (Curran *et al.* 1994) و واسرشتگی اولیه: سه دقیقه در ۹۴°C، ۳۵ چرخه شامل: واسرشتگی به مدت یک دقیقه در ۹۴°C، اتصال آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی به مدت یک و نیم دقیقه در ۵۵°C، گسترش آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی در دو دقیقه در ۷۲°C و درنهایت گسترش نهایی آغازگرهای الگونوکلئوتیدی بمدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C انجام شد.

تکثیر و نگهداری نماتد سیستی کلم

برای تکثیر نماتد در گلخانه از سیست‌هایی که با محلول هیپوکلریت سدیم با غلظت ۰/۶٪ به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی سطحی شده بودند، استفاده گردید. خاک مورد استفاده به نسبت ۱:۳ از خاک زراعی و ماسه تهیه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C و فشار یک اتمسفر سترون گردید. گلدان‌های پلاستیکی به قطر و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر و با وزن حدود دو کیلوگرم از خاک فوق پر و بذور گیاهان میزبان شامل کلم‌قمری و کلم‌برگ در آنها کاشته شدند و در کنار هر بذر ۵ تا ۱۰ سیست ضدعفونی‌شده حاوی تخم قرار داده شد (Jabbari Ghazani, 2015). گلدان‌ها در شرایط ۱۶ ساعت تاریکی و هشت ساعت نور و در دمای ۲۵°C به مدت شش ماه نگه-

داری گردیدند.

استخراج نماتدها از گیاهان آلوده

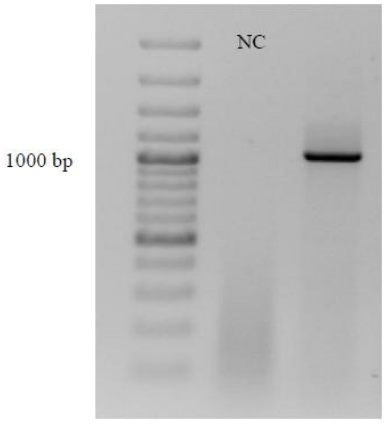
گیاهان کلم در زمان‌های مختلف رشدی همراه با ریشه از خاک خارج شده و پس از حذف خاک و شستشو با آب، نماتدهای داخل ریشه به‌جز سن دوم به کمک پنس و سوزن در زیر استرئومیکروسکوپ جدا گردید. نماتدهای جمع‌آوری شده بلافاصله به ازت مایع انتقال یافته و تا زمان استخراج در فریزر با دمای ۸۰°C- نگهداری شدند.

استخراج RNA

برای انجام Next generation sequencing، استخراج RNA با استفاده از کیت Nucleospin®Triprep kit, mini prep, Machery-Nagel- Germany و مطابق با دستوالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. برای تعیین کیفیت RNA از نمونه‌های استخراج شده، یک میکرولیتر از آن‌ها با استفاده از RNA Nano Chip-USA و Agilent RNA 6000 Nano Kit-USA و- Bioanalzyer Agilent 2100 USA بیوآنالیز (زیست‌واکاوی) شد. سپس نمونه‌های با(RIN Factor (RNA integrity مناسب (بالاتر از هفت) به شرکت BGI TECH SOLUTIONS هنگ‌کنگ- چین ارسال شدند.

توالی‌یابی ترانسکریپتوم نماتد سیستی کلم

توالی ترانسکریپتوم نماتد سیستی کلم از مراحل زیستی پس از آلوده‌سازی با روش Next generation sequencing (Illumina) تعیین شد. Assembling با استفاده از نرم‌افزار CLC genomic workbench v 7.0 (CLC Inc, Aaraus, Denmark) و با مولفه‌های Mismatch cost = ۲، Insertion cost = ۳، Deletion = ۳، cost = ۰/۵ Length fraction و ۰/۸ = Similarity



شکل ۱. قطعه تکثیرشده نواحی ITS1-5.8S- ITS2 از ژن ریبوزومی نماتد سیستی کلم با آغازگرهای تکثیرکننده بخش ITS1-5.8S- ITS2.

Fig. 1. The amplified fragment of cabbage cyst nematode ribosomal gene using ITS1-5.8S- ITS2 amplifying primers.

fraction انجام گرفت. بعد از به دست‌آمدن توالی‌های مرتبط با بیماری‌زایی در ترانسکریپتوم، با استفاده از نرم-افزار CLC 7، بلاست (Blastn و Blastx) توالی‌های حاصل، انجام شد و با توالی ژن‌های بیماری‌زایی موجود از نماتدهای بیمارگر گیاهی در پایگاه اطلاعات داده‌ها (NCBI) مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج و بحث

بر اساس مشخصات ریخت‌شناختی، ریخت‌سنجی و داده‌های مولکولی مبتنی بر ناحیه ITS، جمعیت مورد بررسی به‌عنوان گونه *H. cruciferae* شناسایی گردید (Subbotin *et al.* 2010) (شکل ۱ و جدول ۱). حدود ۱۰۲۸ جفت باز در این بخش از توالی ژنوم نماتد سیستی کلم وجود دارد.

شناسایی افکتورهای (ژن‌های) فرضی بیماری‌زایی نماتد سیستی کلم

از ترانسکریپتوم حاصل از جمعیت ایرانی نماتد سیستی

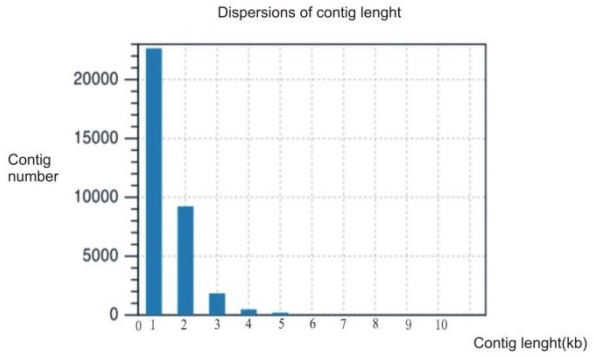
جدول ۱. مشخصات ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی نماتد سیستی کلم جداشده از سبزی‌کاری‌های تبریز.

Table 1. Morpholigical and morphometrical characters of cabbage cyst nematode obtained from Tabriz vegetable growing area.

	Characters	J2	Characters	Cyst	Characters	Male
Morphometric	L	351 ± 15 (333-381)	L	505 ± 58 (400-609)	L	961 ± 83 (829-1029)
	a	20 ± 1.5 (18-24)	b	398 ± 63 (305-571)	a	38 ± 2 (34-41)
	b	4 ± 0.4 (3-5)	b	66 ± 15 (50-84)	a	8 ± 0.9 (8-10)
	b'	2 ± 0.4 (2-3)	L/B	1.3 ± 0.1 (1.1-1.5)	b'	5.3 ± 0.6 (5-6)
	c	9 ± 0.7 (7-10)	Fenestra width	36.6 ± 5 (31-44)	Stylet	23 ± 2 (20-25)
	c'	4 ± 0.3 (3.5-4.4)	Semifenestra length	17 ± 5 (12-22)	Gub	7 ± 1 (6-8)
	Stylet	21 ± 1 (20-22)	VS	42 ± 5 (30-50)	Spic	21 ± 4 (16-26)
	Tail	41 ± 5 (26-47)			T	48 ± 14 (33-68)
	H	21 ± 2 (16-23)				
	H/Stylet	1 ± 0.1 (0.8-1.2)				
Morphologic	Head annules	3-4	Underbridge	Weak	Head annules	5-6
	Lateral lines	4	Gelatinous sac	Present	Lateral lines	4
	Phasmid position	33 % tail length	Cuticle surface pattern	Zigzag		

کلم تعداد ۲۹۲۷۱ کانتیگ (contig) به‌دست آمد. متوسط طول کانتیگ‌ها ۷۰٤ جفت‌باز بوده و ٦٤٪ آن‌ها (حدود ۲۲هزار) دارای طولی کمتر از ۱۰۰۰ جفت باز بودند (شکل ۲). هفده توالی مرتبط با بیماری‌زایی نماتدها در این بررسی از توالی‌های حاصل از نماتد سیستی کلم به‌دست آمد.

۱- β-1,4-endogluconase (cellulase): دو کانتیگ ۲۸۷۹۱ (به‌طول ٤۲۷ نوکلئوتید) و ۲۵۸۲٦ (به‌طول ٤۳۵ نوکلئوتید) با توالی‌های ژن بتا-۱،٤-اندوگلوکوناز موجود در پایگاه اطلاعات داده‌ها شبیه بودند. هر دو با توالی‌های ژن مذکور در *G. rostochiensis* با رس‌شمارهای AF004523.1،AF004716.1 و KF963517.1، *Globodera tabacum* Lownsbery and Lownsbery, 1954 با رس‌شمار AF182393.1 وهم‌چنین *H. glycines* با رس‌شمارهای AY043224 و AF006052.1 شباهت



شکل ۲. نمایه تعداد و طول کانتیگ‌های حاصل از ترانسکریپتوم جمعیت ایرانی نماتد سیستی کلم.

Fig. 2. The profile of Iranian population of cabbage cyst nematode transcriptome contigs number and length.

داشتند. در این میان، بیشترین میزان شباهت (۹۷ درصد) بین کانتیگ ۲۸۷۹۱ نماتد سیستی کلم و آنزیم سلولاز II *G. rostochiensis* (Eng2) (با رس‌شمار AF004523.1) به‌دست آمد. در کانتیگ ۲۸۷۹۱ بخش رمزکننده پروتئین در حدفاصل نوکلئوتیدهای ۱۴۲ تا ۴۳۵ و شامل ۹۸ اسیدآمینه بود. توالی ژن سلولاز از اکثر نماتدهای انگل گیاهی ساکن شامل گونه‌های *Heterodera*، *Globodera* و *Meloidogyne* و نیز انگل‌های داخلی مهاجر مثل گونه‌های *Pratylenchus*، *Ditylenchus africanus* Wendt *et al.*, 1995، *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949، *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhrer, 1934) Nickle, 1970، *Aphelenchoides besseyi* Christie 1942 و گزارش‌شده است (Kikuchi *et al.* 2011؛ Davis *et al.* 2011). توالی این آنزیم از نماتد قلوه‌ای *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, 1940) نیز شناسایی گردیده است (Nyaku *et al.* 2013). بیشتر اندوگلوکونازهای شناسایی‌شده در نماتدها متعلق به خانواده گلیکوزیل هیدرولاز شماره ۵ (GHF5) هستند (Davis *et al.* 2011)، اما در *A. besseyi* و *B. xylophilus* اندوگلوکانازهای شناسایی‌شده به خانواده GHF 45 تعلق دارند که دلیل آن احتمالا تغذیه این دو نماتد از قارچ‌ها می‌باشد (Kikuchi *et al.* 2014). البته استثناهایی هم وجود دارد. به عنوان مثال آنزیم بتا-۱،۴-اندوگلوکوناز موجود در *Aphelenchus avenae* Bastian, 1865 که یک قارچ‌خوار است، نیز عضوی از GHF5 می‌باشد (Karim *et al.* 2009). آنزیم سلولاز از غدد مری نماتدها ترشح شده و در نرم‌کردن بافت گیاهان میزبان نقش دارد (Davis *et al.* 2000).

شباهت زیاد بین توالی این ژن در نماتد سیستی کلم و نماتد سیستی سیب‌زمینی تاییدکننده تعلق سلولاز نماتد سیستی کلم همانند سایر نماتدهای انگل گیاهی به گروه GHF5 می‌باشد. توالی‌های مربوط به ژن بتا-۱،۴-اندوگلوکوناز که از ترانسکریپتوم نماتد سیستی کلم شناسایی شده بودند با رس‌شمارهای KP165069 و KP165070 در پایگاه اطلاعات داده‌ها ثبت شده‌اند.

۲- pectate lyase. این ژن از نماتدهای سیستی طلایی سیب‌زمینی، چغندرقند و سویا گزارش شده است. کانتیگ شماره ۲۵۲۳۳ از ترانسکریپتوم نماتد سیستی کلم که دارای ۶۴۲ نوکلئوتید بود، با توالی‌های در دسترس این ژن در پایگاه اطلاعات داده‌ها به میزان بین ۵۸ تا ۶۸٪ شباهت داشت. در این کانتیگ نوکلئوتیدهای موجود در حدفاصل شماره ۲۹ تا ۵۵۳ رمزکننده این ژن هستند.

در نماتدهای انگل گیاهی، پکتات‌لیاز و پلی‌گالاکتوروناز دو آنزیم اختصاصی برای تجزیه و دپلیمریزه‌کردن پکتین می‌باشند. آنزیم پکتات‌لیاز از باکتری‌ها، قارچ‌های بیمارگر گیاهی و نماتدهای انگل گیاهی ساکن (*Globodera*، *Heterodera* و *Meloidogyne*) و مهاجر (*B. xylophilus*) گزارش و همسانه‌سازی شده است که از غدد مری این نماتدها ترشح شده و کار نرم‌کردن بافت گیاهی را برای تسهیل حرکت نماتد در داخل گیاه فراهم می‌کنند (Davis *et al.* 2011). گزارش‌هایی از وجود این ژن در نماتدهای قارچ‌خوار مثل *A. avenae* نشان‌دهنده پراکنش نسبتا وسیع ژن پکتات‌لیاز در بین انواع نماتدها است. منشاء و خاستگاه این ژن در نماتدها متنوع بوده و گمان می‌رود با افزایش تعداد گزارش‌های توالی آن در نماتدهای مختلف، امکان تعیین دقیق خاستگاه آن مقدور گردد (Davis *et al.* 2011). توالی مربوط به ژن پکتات لیاز که در این بررسی از نماتد سیستی کلم شناسایی شده است، با رس‌شمار KP165066 در پایگاه اطلاعات داده‌ها ثبت گردید.

۳- Chitinase: توالی این ژن از نماتد سیستی سویا، با

رس‌شمار AF4686 قبلا ثبت شده است. کانتیگ شماره ۳٤۰۰ از ترانسکریپتوم نماتد سیستی کلم ۹۲٪ با این توالی شباهت نشان داد. این کانتیگ شامل ۱۱۵۵ نوکلئوتید بوده و از نوکلئوتید ٦٦ تا ۱۰٦٤ رمزکننده ژن کیتیناز می‌باشد. این ژن از نماتدهای قارچ‌خوار مثل *A. avenae* نیز گزارش شده است و در نماتدهای انگل گیاهی به‌طور اختصاصی از غدد کنارشکمی مری ترشح می‌شود (Davis *et al.* 2011). با توجه به این‌که این آنزیم تنها در مرحله بیماری‌زایی نماتد ترشح می‌شود و از طرف دیگر گیاهان فاقد کیتین هستند، نقش این آنزیم در بیماری‌زایی نماتدهای انگل گیاهی نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد (Gao *et al.* 2003). این احتمال وجود دارد که وجود ژن کیتیناز در نماتدها برای مقابله و تأثیر روی سایر عوامل بیماری‌زای گیاهی مانند قارچ‌ها که در محل نفوذ نماتد در گیاه میزبان وجود دارند، بوده و برای کاستن از میزان رقابت بین آن‌ها باشد (Davis *et al.* 2009). توالی مربوط به ژن کیتیناز نماتد سیستی کلم با رس‌شمار KP165065 و در بانک اطلاعات داده‌ها ثبت شد.

٤- major sperm protein. این ژن در پایگاه اطلاعات داده‌ها از نماتد سیستی سیب‌زمینی با رس‌شمارهای L24499.1، L24501.1 و L24500.1 ثبت گردیده است. توالی موجود در ترانسکریپتوم نماتد سیستی کلم به میزان ۹۹٪ با این ژن‌ها شباهت نشان می‌دهد. هم‌چنین این ژن از سایر نماتدهای بیماری‌زای گیاهی از جمله *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood 1949، *Meloidogyne incognita* Chitwood, 1949 و *R. reniformis* گزارش شده است (Nyaku *et al.* 2013). این توالی در NCBI با رس‌شمار KP165064 به ثبت رسید.

٥- ubiquitin extension protein. کانتیگ شماره ۱۲۱۱٦ در نماتد سیستی کلم دارای ۹۹٪ شباهت با توالی ژن رمزکننده ubiquitin extension protein در نماتدهای سیستی سویا و سیب‌زمینی بود که به‌ترتیب با رس‌شمارهای JX308827.1 و AF469060 در پایگاه اطلاعات داده‌ها ثبت شده‌اند، می‌باشد. این کانتیگ دارای ۳۸۳ نوکلئوتید بوده و پروتئین مذکور توسط نوکلئوتیدهای ۳ تا ۳۳۳ آن رمز می‌شود. علاوه بر توالی‌های ثبت‌شده فوق، دو پروتئین ubiquitin extension از نماتد سیستی چغندرقند جداسازی و شناسایی گردیده است (Tytgat *et al*, 2004). منشاء این پروتئین غده پشتی مری است (Gao *et al.* 2003). عملکرد آن سرکوب واکنش دفاعی میزبان می‌باشد (Kikuchi *et al.* 2017). این توالی با رس‌شمار KP165059 در پایگاه اطلاعات داده‌ها به ثبت رسانده شد.

٦- peroxiredoxin. توالی این ژن که قبلاً از نماتد سیستی سیب‌زمینی (*G. rostochiensis*) و نماتد *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 با رس‌شمارهای KF963527.1 و JQ609353.1 ثبت شده است، با کانتیگ شماره ٦۲۸ نماتد سیستی کلم به‌ترتیب ٦۰ و ۵۸٪ شباهت داشت. محل تولید این آنزیم در هیپودرم نماتد است و در سطح بدن لاروهای سن دوم نماتد سیستی سیب‌زمینی حضور داشته و آن‌ها را در برابر میزبان محافظت می‌کند (Kikuchi *et al*. 2017). نحوه انتقال این آنزیم به سطح بدن نماتد و محل ترشح آن‌ها هم‌چنان نامشخص است (Robertson *et al.* 2000). بر اساس منابع در دسترس، توالی این ژن از نماتدهای سیستی جنس *Heterodera* تاکنون گزارش نشده است. در این بررسی توالی به‌دست‌آمده از این ژن در ترانسکریپتوم نماتد سیستی کلم با رس‌شمار KP165058 در پایگاه اطلاعات ثبت گردید.

۷- aldolase. حدود ۱۰ توالی متفاوت متعلق به ژن آلدولاز از بی‌مهرگان مختلف گزارش شده است. از

نماتـدهای آزادزی، انگـل جـانوری و انگـل گیـاهی (*G. rostochiensis* و *H. glycines*) نیـز شناسـایی و بـه ثبـت رسیده است (Kovaleva *et al.* 2005). تـوالی مربـوط بـه ایـن ژن از نماتـد سیسـتی سـیب‌زمینـی بـا رس‌شـمار AY160988 در پایگاه اطلاعات داده‌ها در دسترس اسـت. با انجام بلاست مشخص شد که کانتیگ شماره ٦٤٨ با ایـن توالی به میزان ۸۵٪ شباهت دارد. آلدولاز در نماتد سیسـتی سیب‌زمینی از ۳٦۵ اسیدآمینه ساخته شـده و وزن ملکـولی آن حدود ٤۰ کیلودالتـون اسـت (Kovaleva *et al.* 2005). کانتیگ حاوی توالی رمزکننده ژن آلدولاز در نماتد سیستی کلم که با رس‌شمارKP165056 در پایگـاه اطلاعـات ثبـت گردیـده اسـت، دارای منطقـه رمزکننـده متشـکل از ۹٤٦ نوکلئوتید بوده و ۳۱۵ اسید آمینه را رمز مـی‌کنـد. بیـان ژن آلدولاز در مراحل تخم، لارو و بالغ نماتدهای انگل گیـاهی ثابت شده است. بررسی‌ها نشان داده‌اند که در مرحله تخـم و لارو مهاجم، میزان تولید این ژن بیشـتر از سـایر مراحـل زیسـتی نماتـد اسـت (Kovaleva *et al.* 2005). خـاموش کردن ژن آلـدولاز در نماتـد سیسـتی سـویا سـبب کـاهش چشـمگیری در تعـداد افـراد مـاده بـالغ گردیـده اسـت (Youssef *et al.* 2013).

۸- annexin. این ژن از *Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975 و *H. avenae* گزارش شده اسـت و کانتیگ شماره ٤۹۹۸ ترانسکریپتوم نماتد سیستی کلـم بـا این توالی‌ها شباهت نشان داد. میزان این شباهت بـا نماتـد سیسـتی غـلات (KJ562871.1) حـدود ۹۹٪ و بـا نماتـد سیستی سیب‌زمینی (AJ300178.1) حدود ۸۵٪ است. ایـن کانتیگ دارای ۱۱۷۱ نوکلئوتیـد بـوده و ۹۸۰ نوکلئوتیـد آن در بازه ۱۵۵ تـا ۱۱۳۵ آنکسـین را رمـز مـی‌نماینـد. تـوالی شناسایی‌شده از ژن آنکسین در نماتد سیستی کلم بـا رس-شمار KP165055 در پایگاه اطلاعـات داده‌هـا ثبـت شـده است. آمفیدها، سلول‌های منشاء لوله جنسی و بخـش‌هـای ماهیچه‌ای حباب میـانی مـری محـل بیـان ژن آنکسـین در نماتد سیستی سیب‌زمینی می‌باشند (Fioretti *et al.* 2001). این در حالی است که در نماتد سیستی چغندرقند و نماتـد سیستی سویا غده پشتی مری را محل ترشح این آنزیم می-دانند. آنکسین از آن دسته افکتورهایی است که گفتـه مـی-شود توسط نماتدها و با تقلید از میزبانشان ساخته می‌شـود (Patel *et al.* 2010).

۹- galectin (grg). کانتیـــگ شـــماره ۲٦۵٦ ترانسـکریپتوم نماتـد سیسـتی کلـم بـا تـوالی ژن گـالکتین موجود در بانـک اطلاعـات داده‌هـا کـه مربـوط بـه نماتـد سیستی سیب‌زمینی اسـت (AF002989.1) بـه میـزان ٤۱٪ شباهت داشت. بخش رمزشونده این کانتیگ که گالکتین را تولید می‌کند بین نوکلئوتیدهای ۱۰٤۳ تا ۱٦۹۳ واقع‌شـده و ٦۵۰ نوکلئوتید را شامل می‌شـود. تـوالی ایـن ژن از نماتـد ریشه گرهـی (Dubreuil *et al.* 2007) نیـز گـزارش شـده است. در نماتد ریشه گرهی (*M. incognita*) بیان ایـن ژن در لاروهای سن دو و سه وجود دارد در سـایر موجـودات عملکرد آن مداخله در سامانه ایمنی بیـان شـده اسـت، امـا درباره عملکرد گالکتین در نماتدها تا بـه‌حـال اظهـارنظری صورت نگرفته است (Dubreuil *et al.* 2007). رس‌شـمار توالی ژن گالکتین نماتد سیستی کلم KP165054 می‌باشد.

۱۰- VRFamid receptor: توالی این ژن در نماتد *G. pallida* گزارش شده است و کانتیگ شـماره ۳۹۱۵ نماتـد سیسـتی کلـم بـه میـزان ۹۹٪ بـا ایـن تـوالی شـباهت دارد.VRFamid receptor نوروپپتیـــدهایی (پپتیـــدهای عصبی) هستند که در بی‌مهرگان وجود دارد و تـوالی آن‌هـا در نماتدها حفاظت‌شده بوده و کمتـر دسـتخوش تغییـرات قرار گرفته است. منشاء این آنزیم در لارو سـن دوم نماتـد سیستی سیب‌زمینی در حلقه عصبی، رشته عصبی شکمی و

گانگلیون عصبی در ناحیه عقبی بدن (Lumbar) بوده و خاموش‌کردن این ژن در نماتد سبب کاهش میزان حرکت آن شده است (Atkinson *et al.* 2013). توالی رمزکننده این پروتئین در نماتد سیستی کلم شامل ۵۳۳ نوکلئوتید بوده و با رس‌شماره KP165053 در بانک اطلاعات به ثبت رسیده است.

۱۱- **14-3-3**: کانتیگ شماره ۸۰۰ نماتد سیستی کلم دارای ۱۵۷۵ نوکلئوتید است و شباهتی به میزان ۷۶ و ۷۷٪ با توالی آنزیم ۳-۳-۱٤ گزارش‌شده از نماتدهای انگل گیاهی *D. destructor* و *B. xylophilus* دارد که به‌ترتیب با رس‌شمارهای HQ123250.1 و JQ314423.1 در پایگاه اطلاعات داده‌ها ثبت شده‌اند. دو ژن رمزکننده این آنزیم که از غده پشتی مری و یا سلول‌های منشاء لوله جنسی ترشح می‌شوند و در تمامی مراحل زیستی نماتد ریشه گرهی *M. incognita* بیان می‌گردند، شناسایی و تعیین توالی شده‌اند (Jauberta *et al.* 2004). آنزیم حاصل از توالی ژن ۳-۳-۱٤ یک گروه پروتئینی اختصاصی برای موجودات یوکاریوت بوده و عملکردهای مختلفی از جمله چاپرون (Chaperon) و آداپتور (Adaptor) برای آن در نظر گرفته شده است (Bellafiore *et al.* 2008). توالی نوکلئوتیدی ژن ۳-۳-۱٤ نماتد سیستی کلم با رس‌شمار KP165068 در پایگاه اطلاعات داده ثبت گردید. لازم به ذکر است که این توالی با ژن‌های گزارش‌شده از نماتد سیستی سیب‌زمینی، نماتد قلوه‌ای و گره ریشه ثبت‌شده در NCBI مشابهت کمی داشته و میزان Query cover آن‌ها کم‌تر از ۵۰ می‌باشد.

۱۲- **glutathione peroxidase**. کانتیگ شماره ۱٦٥۳٤ به‌دست‌آمده از نماتد سیستی کلم با توالی ژنی از نماتد طلایی سیب‌زمینی که با رس‌شمار KF963525.1 در پایگاه اطلاعات داده‌ها ثبت شده است، به میزان ۸۱٪ شباهت داشت. این توالی مربوط به ژن glutathione peroxidase بوده و با نام Gpx1 معرفی گردیده است (Jones *et al.* 2004) توالی رمزکننده ژن glutathione peroxidase در نماتد سیستی کلم که با رس‌شمار KP165067 در پایگاه اطلاعات داده‌ها ثبت گردید دارای ٦۲۷ نوکلئوتید بوده و ۲۰۹ اسیدآمینه را رمز می‌کند. توالی glutathione peroxidase از کلیه مراحل آلوده‌کننده نماتد سیب‌زمینی جداسازی شده است و از هیپودرم نماتد ترشح می‌گردد (Jones *et al.* 2004). نقش این آنزیم در زمان رویارویی نماتد انگل با گیاه بوده و ساخت و ترشح آن توسط نماتد سبب محافظت آن در برابر پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تولیدشده توسط گیاه میزبان می‌باشد (Robertson *et al.* 2000).

۱۳- **chorismate mutase**: این ژن از نماتدهای سیستی مختلف از جمله *G. rostochiensis*، *G. pallida*، *G. tabacum*، *H. schachtii* و *H. glycines* به ترتیب با رس‌شمارهای EF437154.1، HM148921.1، HM148920.1، DQ176597.1 و AY227803.1 گزارش شده است. در ترانسکریپتوم نماتد سیستی کلم کانتیگ شماره ۱٥٦٦۰ که شامل ۱۱٥٤ نوکلئوتید است، با رس-شمار KP114551 در پایگاه اطلاعات داده‌ها ثبت شد. کوریسمات میوتاز اولین بار در نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* شناسایی شد و میزان این آنزیم در اطراف سر نماتد و بخش‌های نزدیک به سلول تغذیه‌ای نماتد بسیار زیاد است. گزارش شده است که این آنزیم از غدد مری منشاء گرفته و عملکرد آن در تنظیم میزان اکسین و یا سالیسیلیک اسید است که گیاه به‌عنوان دفاع در برابر نماتدها ترشح می‌کند (Doylwe & Lambert 2003). آنزیم کوریسمات میوتاز درحال حاضر در سلسله جانوران تنها از نماتدهای انگل گیاهی گزارش شده است و آنزیمی

اختصاصی برای گیاهان و باکتری‌ها محسوب می‌شود (Roberts *et al.* 1998). این آنزیم در چرخه شیکیمیک اسید دخالت دارد. گفته می‌شود تأثیر کوریسمات میوتاز با ایجاد تغییرات در میزان اکسین و یا اسید سالیسیلیک و در میزان واکنش دفاعی گیاهان میزبان است (Doylwe & Lambert 2003) در حال حاضر گزارش‌هایی از حضور و ترشح این آنزیم در نماتدهای سیستی سویا و سیب‌زمینی وجود دارد (Bekal *et al.* 2003؛ Gao *et al.* 2003؛ Jones *et al.* 2005).

۱۴- calreticulin: توالی این ژن از نماتدهای *D. destructor* و *B. xylophilus* و با رس‌شمارهای GU585910.1 و GQ396798.1 در بانک اطلاعات ثبت گردیده است. کانتیگ شماره ۳۴۷ ترانسکریپتوم نماتد سیستی کلم به‌ترتیب به میزان ۴۳ و ۳۵٪ با این توالی‌ها شباهت دارد. به‌علت میزان شباهت نسبتا کمتر، اقدام به انجام Blastx برای حصول اطمینان از پروتئین ترشحی حاصل از این توالی شد و نتایج نشان داد که توالی این کانتیگ مربوط به پروتئین ترشحی کالریتیکولین است. رس‌شمار اختصاص‌یافته به توالی ژن کالریتیکولین نماتد سیستی کلم در پایگاه اطلاعات داده‌ها، KP165063 می‌باشد. این آنزیم از غدد مری نماتد در مراحل بیماری‌زایی نماتدهای مهاجر و ساکن ترشح شده و در تشکیل و دوام محل‌های تغذیه‌ای نماتدها نقش دارد که این مسأله اولین بار با شناسایی تجمع کالریتیکولین در دیواره سلولی سلول‌های تغذیه‌ای که در مجاورت سر نماتد *M. incognita* قرار داشتند، ثابت شد (Jaubert *et al.* 2005). هم‌چنین سه کانتیگ مشابه با این ژن از نماتد قلوه‌ای شناسایی و گزارش گردیده است (Nyaku *et al.* 2013).

۱۵- calmodulin(CMD-1): کانتیگ شماره ٦٦٥٥ ترانسکریپتوم نماتد سیستی کلم با انجام Blastn با توالی ژن کالمودولین نماتد سیستی سویا (KC109791.1) به میزان ۳۷٪ شباهت داشت. در Blastx با پروتئین (CMD-1) گزارش‌شده (NP503386.1) از نماتد مدل *Caenorhabditis elegans* Maupas, 1900 نیز همین میزان شباهت را نمایان کرد. بخش رمزکننده این پروتئین در نماتد سیستی کلم ٤٤٥ نوکلئوتیدی بوده و ١٤٨ اسیدآمینه را شامل می‌شود. این توالی که نماتد سیستی کلم گزارش می‌شود، در پایگاه اطلاعات داده‌ها با رس‌شمار KP165062 ثبت گردید.

۱۶- venum allergene like protein: توالی ژنی شناسایی‌شده از ترانسکریپتوم نماتد سیستی کلم به عنوان venum allergene like protein با ۱۲٪ شباهت، کم‌ترین میزان را با ژن‌های متناظر گزارش‌شده از نماتدهای سیستی سیب‌زمینی و سویا نشان داد و نتایج حاصل ازBlastn و Blastx شبیه به‌هم بود. این ژن از نماتد زخم ریشه *Pratylechus coffeae* (Zimmermann 1898) Filipjev & Schuurmans Steckhoven, 1941 نیز گزارش شده ولی توالی شناسایی‌شده از ترانسکریپتوم نماتد سیستی کلم با آن شباهتی ندارد. قسمت رمزکننده این پروتئین شامل ۲۰۸ اسیدآمینه (نوکلئوتیدهای حدفاصل بین ١١٦-٧٤٢) می‌باشد. این توالی در کانتیگ شماره ۱۱۰۳۱ از ترانسکریپتوم نماتد سیستی کلم بود و با رس‌شمار KP165060 در پایگاه اطلاعات داده‌ها ثبت گردید. عملکرد این ژن کاهش میزان واکنش دفاعی میزبان نماتد با مداخله در عملکرد گیرنده‌های دفاعی سطح سلول‌ها می‌باشد (Lozano-Torres *et al.* 2014).

۱۷- arginin kinase. ژن آرژینین کیناز (AK) عضوی از آنزیم‌های خانواده کیناز است که نقش مهمی در حفظ تعادل سطح ATP در سلول‌ها دارد (Pereira *et al.* 2000). این ژن از بی‌مهرگان مختلفی از جمله نماتدها جداسازی و

شناسایی شده و عملکرد آن را تأثیر در انقباض ماهیچه‌ها در طی فعالیت شدید موجود زنده و نیز تأمین منبع انرژی در طول دوره‌های کوتاه تنش می‌دانند. میزان بسیار بالای این ژن در ترانسکریپتوم نماتد سیستی سویا نشان‌دهنده نقش آن در بقای نماتد در شرایط تنش تلقی شده است (Matthews *et al.* 2010). در ترانسکریپتوم نماتد سیستی کلم کانتیگ شماره ۳۹۱۵ شباهت ۸۳ درصدی با توالی AK2 گزارش‌شده از نماتد سیستی سویا داشت. توالی AK2 در نماتد سیستی سویا دارای قسمت بیان‌شونده (ORF) ***حدود*** ۱۲۲۱ نوکلوتیدی است که پروتئینی با ٤٠٧ اسیدآمینه و به وزن ٤٦ کیلودالتون را رمز می‌کند (Matthews *et al.* 2010). این کانتیگ در نماتد سیستی کلم دارای ١٤٦٩ نوکلئوتید بوده و ۱۲۱۷ نوکلئوتید آن رمزکننده پروتئینی با ٤٠٥ اسید آمینه می‌باشد. KP165052 رس‌شمار اختصاص داده‌شده به ثبت توالی ژن آرژینین کیناز در ترانسکریپتوم نماتد سیستی کلم در بانک اطلاعات است.

علاوه بر ژن‌هایی که در بالا عنوان شد، دو توالی دیگر هم از نماتد سیستی کلم در پایگاه داده‌ها به ثبت رسیده است. این ژن‌ها عبارتند از UNC-15 و UNC-87 که به‌ترتیب کانتیگ‌های شماره ٤٢٠٧ و ٦٦٥٥ نماتد سیستی کلم را شامل می‌شوند. UNC-87 از نماتد سیستی سویا نیز با رس‌شمار AY672636.1 گزارش شده است و ۸۳٪ شباهت بین توالی این ژن در نماتد سیستی سویا و نماتد سیستی کلم وجود دارد. توالی ژن UNC-87 موجود در ترانسکریپتوم نماتد سیستی کلم با رس‌شمار KP165061 در پایگاه اطلاعات داده‌ها ثبت شد. کانتیگ ٤٢٠٧ که توالی ژنUNC-15 را در بر دارد با توالی که از نماتد *C. elegans* در پایگاه اطلاعات داده‌ها ثبت شده است (XM_003096779.1) به میزان ۹۰٪ شباهت داشت. توالی این ژن نیز با رس‌شمار KP165058 و برای اولین بار در پایگاه اطلاعات داده‌ها به ثبت رسید.

مقایسه ژن‌های بیماری‌زایی ارائه‌شده در این بررسی با گزارش‌های قبلی از سایر نماتدهای بیماری‌زای گیاهی نشان داد که تعدادی از آن‌ها مثل β-1,4-endoglucanase و pectate lyase که ظاهراً در بین نماتدهای بیمارگر گیاهی عمومیت دارند، در *H. cruciferae* نیز یافت گردیدند. با این‌که توالی‌های مربوط به xylanase، 16D10، expansin و cathepsin از سایر نماتدها قبلاً ثبت گردیده‌اند اما توالی مشابه آن‌ها در داده‌های ترانسکریپتوم نماتد سیستی کلم یافت نشد.

در مجموع، در این بررسی هفده توالی مرتبط با بیماری‌زایی نماتد سیستی کلم (جدول ۲) از مراحل لاروی سن سه، چهار و افراد بالغ گزارش گردید. کلیه این توالی‌ها برای اولین بار از نماتد سیستی کلم گزارش می‌شوند.

منابع

Atkinson L. E., Stevenson M., McCoy C. J., Marks N. J., Fleming C., Zamanian M., Day T. A., Kimber M. J., Maule A. G. and Mousley A. 2013. Flp -32 Ligand/receptor silencing phenocopy faster plant pathogenic nematodes. PLOS Pathogens 9(2): e1003169.

Bekal S., Niblack T. L. and Lambert K. N. 2003. A chorismate mutase from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* shows polymorphism that correlate with virulence. Molecular Plant Microbe Interactions 1: 439–446.

Bellafiore S., Shen Zh., Rosso M. N., Abad P., Shih P. and Briggs S. P. 2008. Direct identification of the

جدول ۲. لیست ژن‌های فرضی شناسایی شده از نماتد سیستی کلم و مقایسه آن با گزارش‌های قبلی.

Table 2. The list of ideitified putative parasitism genes from cabbage cyst nematode in comparision with previous reports.

نام ژن Gene	نام گونه نماتد Species	محل ترشح Origion	عملکرد Function	رس شمار *Accession number*
Endo-1,4-beta-glucanase	*Pratylenchus coffeae* *Rotylenchulus reniformis* *Heterodera glycines* *Heterodera schachtii* *Globodera rosthochiensis* *Globodera tabacum* *Meloidogyne javanica* *Heterodera cruciferae**	Oesophageal glands Oesophagous	Softening host plants cell wall	KP165069 KP165070
Pectate lyase	*Heterodera glycines* *Rotylenchulus reniformis* *Pratylenchus coffeae* *Heterodera schachtii* *Globodera rosthochiensis* *Meloidogyne incognita* *Meloidogyne javanica* *Heterodera cruciferae**	Oesophageal glands Oesophagous	Softening host plants cell wall to facilitate the movement of nematodes inside the plant	KP165066
Annexin	*Heterodera glycines* *Pratylenchus coffeae* *Heterodera cruciferae**	******	******	KP165055
Chorismate mutase	*Meloidogyne incognita* *Meloidogyne javanica* *Globodera pallida* *Heterodera glycines* *Pratylenchus coffeae* *Heterodera cruciferae**	Oesophageal dorsal and ventral glands	Adjustment the amount of auxin or salicylic acid	KP114551
Ubiqutin extension protein	*Heterodera schachtii* *Heterodera glycines* *Heterodera cruciferae**	Oesophageal dorsal gland	Suppression host defence	KP165059
Chitinase	*Heterodera schachtii* *Heterodera glycines* *Heterodera cruciferae**	Oesophageal subventral glands	Coping and effect on other plant pathogenic factors present at the site of nematode penetration to host in order to reduce the competition between them	KP165065

Table 2. Continued.

جدول ۲. ادامه.

نام ژن Gene	نام گونه نماتد *Species*	محل ترشح Origion	عملکرد Function	رس شمار Accession number
Venom allergen-like protein	*Heterodera schachtii* *Meloidogyne incognita* *Heterodera glycines* *Heterodera cruciferae**	Oesophageal subventral glands	Reducing host defense rate to nematodes via interfering in surface defensive receiver	KP165060
Aldolase	*Globodera rosthochiensis* *Heterodera glycines* *Heterodera cruciferae**	******	Scilencing of the gene has greatly decrease the number of female reaching maturity	KP165056
VRFamid receptor	*Globodera rosthochiensis* *Heterodera cruciferae**	******	Scilencing of the gene has reduced its rate of nematode movement	KP165053
Galectin	*Pratylenchus coffeae* *Meloidogyne incognita* *Globodera rosthochiensis* *Heterodera cruciferae**	******	******	KP165054
Major Sperm Protein	*Heterodera glycines* *Heterodera cruciferae**	******	******	KP165064
Calreticulin	*Pratylenchus coffeae* *Rotylenchulus reniformis* *Heterodera cruciferae**	Oesophageal dorsal and ventral glands	Establishmment and permanency of nematode feeding site	KP165063
14-3-3	*Rotylenchulus reniformis* *Meloidogyne incognita* *Pratylenchus coffeae* *Heterodera cruciferae**	Oesophageal dorsal gland/ The genital branch's premordium cells	Chaperon and Adaptor	KP165068
Glutathione peroxidase	*Aphelenchoides besseyi* *Rotylenchulus reniformis* *Pratylenchus coffeae* *Heterodera cruciferae**	Hypodermis	Protects the nematode against the H_2O_2 produced by the host plant against the nematode	KP165067
Peroxiredoxin	*Pratylenchus coffeae* *Heterodera cruciferae*	Hypodermis	The enzyme is present in the surface area of the j2 of and preserves nematodes against the host	KP165058
Arginine kinase	*Hetrodera glycines* *Heterodera cruciferae**	******	In muscles contraction during intense activity and supplying energy source during short periods of stress	KP165052
Calmodulin	*Heterodera cruciferae**	******	******	KP165062

Meloidogyne incognita secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. PLOS Pathogens 4(10): e1000192.

Curran J., Driver F., Ballard J. W. C. and Milner R. J. 1994. Phylogeny of *Metarhizium*: Analysis of rhibosomal DNA sequence data. Mycological Research 98(5): 547-555.

Davis E. L, Hussey R. S., Baum T. J., Bakker J., Schots A., Rosso M. N. and Abad P. 2000. Nematode parasitism genes. Annual Review of Phytopathology 38: 365-396.

Davis E. L., Hussey and R. S., and Baum T. J. 2009. Parasitism genes: What they reveal about parasitism, Pp. 15-44. In: R. H. Berg. and G. Ch. Taylor (Eds.). Cell Biology of Plant Nematode. Springer. Germany.

Davis E. L., Haegeman A. and Kikuchi T. 2011. Degradation of plant cell walls by nematodes, pp. 255-273. In: In: J. Jones, G. Gheysen and C. Fenoll (Eds). Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interaction. Springer. Germany.

Doylwe E. L. and Lambrt K. N. 2003. *Meloidogyne javanica* chorismate mutase1 alters plant cells development. Molecular Plant Microbe Interactions 16: 123–131.

Dubreuil G., Magliano M., Deleury E., Abad P. and Rosso M. N. 2007. Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism. New Phytologist 176(2): 426–436.

Escobar C., Brown S. and Mitchum M. G. 2011. Transcriptomic and proteomic analysis of the plant responses to nematode infection, pp. 157-174. In: J. Jones, G. Gheysen and C. Fenoll (Eds). Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interaction. Springer. Germany.

Fenwick D. W. 1940. Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. Journal of Helminthology 18: 155-172.

Fioretti L., Warry A., Porter A., Haydock P. and Curtis R. 2001. Isolation and localisation of an annexin gene (gp-nex) from the potato cyst nematode, *Globodera pallida*. Nematology 3(1): 45–54.

Franklin M. T. 1945. On *Heterodera cruciferae* n. sp. of Brassica and on a *Heterodera* strain infecting clover and dock. Journal of Helminthology 21(2 and 3): 71-84.

Gao B., Allen R., Maier T., Davis E. L., Baum T. J., and Hussey R. S. 2003. The parasitome of the phytonematode *Heterodera glycines*. Molecular Plant Microbe Interactions 16: 720–726.

Jabbari Ghazani H. 2015. Biological parameters, population fluctuations, host range, genetic diversity and pathogenicity of cabbage cyst nematode (*Heterodera cruciferae* Franklin, 1945) in vegetable farmlands of northwest Tabriz. Phd Thesis. 129 p.

Jaubert S., Milac, A. L., Petrescu, A. J., de Almeida-Engler, J., Abad, P. and Rosso M. N. 2005. In planta secretion of a calreticulin by migratory and sedentary stages of root-knot nematode. Molecular Plant Microbe Interactions 18(12): 1277–1284.

Jauberta S., Laffairea J. B., Ledger T. N., Escoubasb P., Amri E. Z., Abad P., and Rosso M. N. 2004. Comparative analysis of two 14-3-3 homologues and their expression pattern in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. International Journal for Parasitology 34: 873–880.

Jones J. T., Reavy B., Smant G. and Prior A. E. 2004. Glutathione peroxidases of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Gene 324: 47–54.

Jones J.T., Furlanetto C. Bakker E., Banks B., Blok V., Chen Q., Phillips M. and Prior A. E. 2005. Characterization of a chorismate mutase from the potato cyst nematode *Globodera pallida*. Molecular Plant Microbe Interactions 4: 43–50.

Karim N., Jones, J. T., Okada H. and Kikuchi T. 2009. Analysis of expressed sequence tags and identification of genes encoding cell-wall-degrading enzymes from the fungivorous nematode *Aphelenchus avenae*. BMC Genomics 10: 525.

Kikuchi T., Eves-van den Akker S., and Jones J. T. 2017. Genome evolution of plant-parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology 55: 14.1-14.22.

Kikuchi T., Cock P. J. A., Helder J. and Jones J. T. 2014. Characterization of the transcriptome of *Aphelenchoides besseyi* and identification of a GHF 45 cellulase. Nematology 16: 99-107.

Kikuchi T., Cotton J. A., Dalzell J. J., Hasegawa K., Kanzaki N., McVeigh P., Takanashi T., Tsai I. J., Assefa S. A., Cock P. J. A., Dan Otto Th., Hunt M., Reid A. J., Sanchez-Flores A., Tsuchihara K., Yokoi T., Larsson M. C., Miwa J., Maule A. G., Sahashi N., Jones J. T. and Berriman M. 2011. Genomic insights into the origin of parasitism in the emerging plant pathogen *Bursaphelenchus xylophilus*. PLOS Pathogens 7(9): e1002219.

Kovaleva E. S., Masler, E. P., Subbotin, S. A. and Chitwood, D. J. 2005. Plant-parasitic nematodes associated with reduced wheat yield in Oregon: *Heterodera avenae*. Journal of Nematology 37(3): 292-296.

Lozano-Torres J. L., Wilbers R. H. P., Warmerdam S., Finkers-Tomczak A., Diaz-Granados A., van Schaik C. C., Helder J., Bakker J., Goverse A., Schots A. and Smant G. 2014. Apoplastic venom allergen-like proteins of cyst nematodes modulate the activation of basal plant innate immunity by cell surface receptors. PLOS Pathogens 10(12): e1004569.

Mahdikhani Moghadam, E. 1998. Identification of two species *Heterodera cruciferae* and *H. carotae* and distribution of *Heterodera* in sugarbeet fields in Mashhad. Proceeding of the 13th Iranian Plant Protection Congress, Volume 2: Plant Diseases & Weeds, Karaj, Iran. P. 139 (Abs.)

Matthews B. F., MacDonald M. H., Thai V. K. and Tucker M.L. 2010. Molecular characterization of arginine kinases in the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). Journal of Nematology 35(3): 252–258.

Nyaku S. T., Sripathi V. R., Wiley G., Najar F. Z., Cseke L. J., Sharma G. C., Roe B. A., Cseke S. B., Ramesh E. M. and Kantety V. 2013. The expressed parasitism genes in the reniform nematode (*Rotylenchulus reniformis*). American Journal of Plant Scinces 4: 780-791.

Patel N., Hamamouch N., Li, H., Hewezi T., Hussey, R. S. Baum Th. J,. Mitchum M. G. and Davis E. 2010. A nematode effector protein similar to annexins in host plants. Journal of Experimental Botany 61(1): 235–248.

Pereira C. A., Alonso G. D., Paveto M. C., Iribarren A., Cabanas M. L., Torres H. N. and Flawia, M. M. 2000. *Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning. The Journal of Biological Chemistry 275: 1495-1501.

Roberts F., Roberts, C. W., Johnson J. J., Kyle D. D., Krell T., Coggins J. R., Coombs G. H., Milhous W. K., Tripori S., Ferguson D. J. P., Chakrabarti D. and McLeod R. 1998. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. Nature 393: 801-805.

Robertson L., Robertson W. M., Sobczak M., Helder J., Tetaud E., Ariyanayagam M. R., Ferguson M. A. J. Fairlamb A. and Jones J. T. 2000. Cloning, expression and functional characterisation of a peroxiredoxin from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Molecular and Biochemical Parasitology 111: 41–49.

Rosso M. N. and Grenier E. 2011. Other nematodes effectors and evolutionary constraints, pp. 287-308. In: J. Jones, G. Gheysen and C. Fenoll (Eds). Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interaction. Springer. Germany.

Smant G., Stokkermans J. P. W. G., Yan Y. T., De Boer J. M., Baum T. J., Wang X.H., Hussey R. S. and Gommers F. J. 1998. Endogenous cellulases in animals: Isolation of beta-1, 4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 4906-4911.

Stone A. R. and Rowe J. A. 1976. *Heterodera cruciferae*. CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, set 6, No, 90. St Albans, UK, Commonwealth Institute of Helminthology 4 pp.

Subbotin S. A., Mundo-Ocampo M. and Baldwin J. G. 2010. Systematics of cyst nematodes (Nematoda: Heteroderinae), Volume 2. Brill NV. Leiden, The Netherlands. 512 p.

Tytgat T., Vanholme B., De Meutter J., Claeys M., Couvreur M., Vanhoutte I., Gheysen G. Van Criekinge W., Borgonie G., Coomans A. and Gheysen G. 2004. A new class of ubiquitin extension proteins secreted by the dorsal pharyngeal gland in plant parasitic cyst nematodes. Molecular Plant Microbe Interactions 17(8): 846–852.

Youssef R. M., Kim K., Haroon S. A. and Matthews B. F. 2013. Post-transcriptional gene silencing of the gene encoding aldolase from soybean cyst nematode by transformed soybean roots. Experimental Parasitology 134: 266–274.