بررسی فعالیت آنزیم بتا- ۱ و ٤ اندوگلوکاناز در سه نماتد بیمارگر گیاهی*

سیده نگین میرقاسمی[۱]، سالار جمالی[۲]**، محمدمهدی سوهانی[۳] و آرش زیبایی[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۲)

چکیده

دیواره سلولی گیاه میزبان، سد مکانیکی اصلی برای نفوذ و مهاجرت نماتدهای انگل گیاهی محسوب می‌شود. این نماتدها جهت تجزیه دیواره سلولی، انواع مختلفی از آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی را ترشح می‌کنند. بتا- ۱ و ٤ اندوگلوکاناز از اولین آنزیم‌های تجزیه کننده شناخته شده در این ارتباط است. در این پژوهش، فعالیت آنزیم مذکور در سه گونه شامل *Pratylenchus loosi*، *Meloidogyne incognita* و *Aphelenchoides besseyi* مورد مطالعه قرار گرفت. ابتدا با انجام نمونه برداری، شناسایی، خالص سازی و تکثیر هر سه گونه نماتد، استخراج DNA انجام شد. سپس با استفاده از پرایمر دژنره اختصاصی و به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، ژن کد کننده آنزیم بتا- ۱ و ٤ اندوگلوکاناز در نماتدهای مذکور تشخیص داده شد. استخراج RNA کل از هر سه گونه انجام شد. بعد از آن، cDNA تهیه و با استفاده از ژن مرجع، درستی cDNA ها مورد بررسی قرار گرفت. سپس شدت بیان ژن کد کننده آنزیم بتا- ۱ و ٤ اندوگلوکاناز برای نمونه‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که ژن کدکننده آنزیم بتا- ۱ و ٤ اندوگلوکاناز، بیشترین فعالیت آنزیمی و شدت بیان را در نماتد مولد گره (*M. incognita*) داشت. نماتد مولد زخم ریشه چای (*P. loosi*) و نماتد نوک سفیدی برگ برنج (*A. besseyi*) به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند.

کلیدواژه: پارازیتیسم، *Pratylenchus loosi*، *Meloidogyne incognita*، *Aphelenchoides besseyi* .

---

* بخشی از رساله دکتری نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jamali@yahoo.com

۱. دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان.

۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان.

۳. دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان.

Study of the activity of β -1,4 endoglucanase enzyme in three plant parasites nematodes*

S.N. Mirghasemi[1], S. Jamali[2*], M.M. Sohani[3], and A. Zibaei[2]

(Received: 3.8.2018; Accepted: 26.3.2019)

Abstract

Host plant cell wall is the main mechanical barrier to penetration and migration by endoparasitic nematodes. In order to degradation of plant cell walls, the nematodes secrete various types of cell wall degrading enzymes. β-1, 4-endoglucanase was the first known cell wall degrading enzyme. In this research, the enzyme activites were studied in three species; *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White 1919) Chitwood, 1949, *Pratylenchus loosi* Loof, 1960 and *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942. Initially, sampling, identification, purification and multiplication of the nematodes were performed and after extraction of their DNA, the encoding β - 1, 4 endoglucanase gene was detected in the nematodes by using pairs of specific degenerate primers in polymerase chain reaction. After extraction of total RNA from three species of nematodes, cDNA was synthesized and determination of cDNA goodness was carried out by a reference gene. Gene expression of the β -1,4 endoglucaase was done for all samples. The results showed that the gene encoding β -1 ,4 endoglucanase had the highest activity and expression in the root- knot nematode *(M. incognita*). Tea root lesion nematode (*P. loosi*) and Rice white tip nematode (*A. besseyi*) were classified in next step, respectively.

Keywords: *Aphelenchoides besseyi* ،*Meloidogyne incognita*، Parasitism، *Pratylenchus loosi*

---

* A part of Ph.D thesis submitted by the first author in Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

**Corresponding author's E-mail: jamali@guilan.ac.ir

1. Ph.D student of plant pathology, Plant Protection Department, Faculty of agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
2. Associate Prof. of plant pathology, Plant Protection Department, Faculty of agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
3. Associate Prof. of plant breeding, Biotechnology Department, Faculty of agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

مقدمه

نماتدهای مولد گره ریشه (*Meloidogyne* spp.) یکی از مهمترین نماتدهای خسارت‌زای گیاهی محسوب می‌شوند. پراکندگی وسیع، دامنه میزبانی گسترده و تعامل با سایر بیمارگرها باعث شده تا این گروه تأثیر بسزایی در میزان خسارت محصولات کشاورزی داشته باشند. خسارت وارده توسط این نماتدها به محصولات کشاورزی، در سراسر جهان سالانه حدود ۵ درصد گزارش شده است که البته در مناطق خاص و کشورهای در حال توسعه بیش از این مقدار می‌باشد (Muturi *et al.* 2010). نماتد مولد زخم ریشه چای، *Pratylenchus loosi* Loof, 1960 یکی از مهمترین عوامل خسارت‌زا در باغ‌های چای ایران و برخی از کشورهای چای‌خیز جهان می‌باشد (Seraji *et al.* 2010). نماتد نوک سفیدی برگ برنج، *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 یکی از نماتدهای انگل بخش هوایی گیاه است که برای اولین بار در سال ۱۹۱۵ از کیوشوی ژاپن گزارش شد. این نماتد پراکنش وسیعی دارد زیرا از طریق بذر به‌سادگی انتشار می‌یابد (Bridge *et al.* 2005). نماتدهای مذکور علاوه بر جنبه خسارتزایی، دارای رفتار تغذیه‌ای متفاوت به ترتیب شامل حالات انگل داخلی ساکن، انگل داخلی مهاجر و انگل خارجی مهاجر بوده که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.

دیواره سلولی گیاه از ساختار سخت و ضخیم میکروفیبریل‌های سلولز، همی سلولز، پکتین و پروتئین تشکیل شده است (Davis *et al.* 2011). نماتدهای انگل گیاهی به منظور تسهیل نفوذ از طریق دیواره سلولی میزبان و جهت گسترش حرکت و تغذیه خود، آنزیم‌های مختلفی ترشح می‌کنند. پروتئین‌های موثر در بیماری‌زایی نماتد، توسط ژن‌های پارازیتیسم غدد مری رمزگذاری شده و از طریق استایلت به درون بافت گیاه راه می‌یابند (Davis *et al.* 2000). اولین شواهد قطعی مبنی بر ترشح پروتئین‌ها از سلول‌های غدد مری از طریق روش ایمونولوکالیزیشن (Immunolocalization) مربوط به ترشحات اندوگلوکاناز لاروهای نماتد سیست هنگام حرکت در بافت ریشه بدست آمد (Davis *et al.* 2011). پژوهش‌های انجام شده نشان داد که تولید پکتیناز و سلولاز در نفوذ نماتد به ریشه میزبان مؤثر است (Doyle & Lambert 2002). ترشحات نماتدهای انگل گیاهی در نفوذ و حرکت لارو سن دوم (J2) در بافت گیاه، تشکیل و نگهداری مکان‌های تغذیه، هضم محتویات سلول برای کسب مواد مغذی و سرکوب پاسخ‌های دفاعی میزبان نقش دارند (Curtis 2007). ژن-های تخریب کننده دیواره سلولی گیاه، ژن‌های کدکننده آنزیمهای سلولاز یا بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز، گالاکتورونان، کیتیناز، زایلاناز، پکتات لیاز، پکتیناز و اکسپنسین‌ها (Expansins) هستند (Davis *et al.* 2011).

ژن کد کننده آنزیم بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز نقش مهمی در نرم کردن و اضمحلال دیواره سلولی در طی برقراری ارتباط پارازیتیسم نماتدهای مختلف، با رفتارهای متفاوت تغذیه ای برعهده دارد. این ژن در دو نماتد *Globodera rostochiensis* Wollenweber, 1923 و Ichinohe, 1952 *Heterodera glycines* شناسایی و آنزیم تولید شده توسط آن‌ها در غدد مری این دو نماتد ردیابی شده است (Smant *et al.* 1998).

روسو و همکاران ژن کد کننده آنزیم بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز به نام *Mi-eng-1* را در لارو سن دوم *Meloidogyne. incognita* (Kofoid & White 1919) Chitwood, 1949 شناسایی و ویژگی‌های مهم این ژن را مورد بررسی قرار دادند (Rosso *et al.* 1999). لانگ و همکاران ویژگی‌های مولکولی و عملکردی دو ژن کد

کننده آنزیم بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز به نام‌های *Ha-eng-2* و *Ha-eng-3* را در نماتد سیست غلات *Heterodera avenae* Mortensen, 1908 شناسایی کردند (Long *et al.* 2013). یوهرا و همکاران دو ژن کد کننده آنزیم بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز به نام‌های *Pp-eng-1* و *Pp-eng-2* را در نماتد *Pratylenchus penetrans* Cobb, 1917 گزارش کردند (Uehara *et al.* 2001). وبن و همکاران ژن آنزیم بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز GHF5 به نام *Rr-ENG-1* را در نماتد *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira شناسایی کردند. تحلیل فیلوژنتیک ژن *Rr-ENG-1* در سطح نوکلئوتید و اسید آمینه نشان داد که این ژن به ژن *Hg-ENG-6* در نماتد سیست سویا شباهت زیادی دارد. همچنین از نظر موقعیت نسبی اگزون/اینترون در توالی پروتئین، شبیه به ژن *Mi-ENG-2* می‌باشد (Wubben *et al.* 2010). فانلی و همکاران چهار ژن کد کننده‌ی آنزیم بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز را در نماتد *Pratylenchus vulnus* Allen and Jensen شناسایی و گزارش کردند (Fanelli *et al.* 2014).

کیکوچی و همکاران ژن کد کننده آنزیم بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز را در نماتد چوب کاج *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhrer, 1934 همسانه‌سازی کرده و خصوصیات عملکردی این ژن را بررسی نمودند و در نهایت مشخص کردند که سلولاز *B. xylophilus* بیشترین شباهت را با سلولازهای قارچی و گلیکوزیل هیدرولاز GHF45 دارد. در صورتی‌که سلولاز نماتد مولد سیست و نماتد مولد گره ریشه متعلق به GHF5 و بیشتر شباهت به سلولاز باکتری‌ها دارد (Kikuchi *et al.* 2004). دیویس و همکاران وجود دو نوع از ژن‌های کد کننده بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز، *ENG1* و *ENG2*، که در سلول‌های غدد مجاور سطح شکمی مری در دو نماتد مولد سیست و مولد گره ریشه بیان می‌شوند، را تأیید کردند (Davis *et al.* 2011). گولنر و همکاران ژن‌های کد کننده آنزیم بتا-۱ و ۴ اندوگلوکاناز را در نماتد سیست توتون *Globodera tabacum* Milne شناسایی و اظهار کردند که بیان ژن‌های *HG-ENG-1* و *HG-ENG-2* در نماتد سیست سویا *Heterodera glycines* Ichinohe و ژن‌های *GT-ENG-1* و *GT-ENG-2* در این نماتد، مؤید نقش آنزیم‌ها در نفوذ و حرکت لارو سن دوم می‌باشند (Goellner *et al.* 2000). گائو و همکاران رونوشت (transcription) ترشحات غدد نماتد *H. glycines* را مورد مطالعه قرار داده و ۵۱ ژن بیماری‌زا گزارش کردند (Gao *et al.* 2003). ژن‌های فرضی بیماری‌زایی مثل ژن‌های سلولاز، کیتیناز، پکتات لیاز، کالمودولین، آنکسین، گالکتین، کوریسمات میوتاز، پراکسی ردوکسین و پراکسیداز در نماتد *Heterodera cruciferae* Franklin شناسایی شده است (Jabbari *et al.* 2018).

کسب اطلاعات لازم در زمینه ژن‌های کد کننده آنزیم-های دخیل در بیماری‌زایی می‌تواند راهگشای تحقیقات بیشتر در خصوص مدیریت و کاهش خسارت نماتدهای انگل گیاهی باشد. بنابراین پژوهش حاضر، با هدف بررسی تفاوت فعالیت و بیان آنزیم بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز در سه نماتد مهم بیماریزای شمال کشور شامل نماتد مولد گره *M. incognita*، نماتد مولد زخم ریشه چای *P. loosi* و نماتد نوک سفیدی برگ برنج *A. besseyi*، با سه مکانیزم مختلف بیماریزایی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

۱) نمونه برداری، شناسایی، خالص سازی و تکثیر نماتدها

به منظور تهیه جمعیت مورد نیاز از نماتد *M.*

incognita، تعدادی نمونه خاک و ریشه از باغات کیوی آلوده استان گیلان جمع آوری و به آزمایشگاه نماتدشناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه گیلان منتقل شد. جهت شناسایی از نقش کوتیکولی قسمت انتهایی بدن ماده بالغ و هم‌چنین مشخصات ریخت‌شناسی لاروهای سن دوم استفاده شد (Jepson, 1985). جهت تکثیر و تهیه جمعیت خالص، تک توده تخم گونه شناسایی شده مجاور ریشه گیاهچه‌های گوجه فرنگی دو تا چهار برگی رقم حساس ارلی اوربانا (Early-Urbana) قرار داده شد و گیاهان در شرایط گلخانه نگهداری شدند. بعد از ۶۰ روز مجدداً ریشه‌های آلوده به گلدان‌های حاوی مخلوط ماسه، خاک مزرعه، کود برگ و پرلیت تقسیم و گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی دو برگی در آنها نشاء شدند و در گلخانه با دمای ۳۲-۲۸ درجه سلسیوس و ۱۶ ساعت روشنایی نگهداری شدند. در انتهای دوره، ریشه‌های گوجه فرنگی‌های آلوده حاوی جمعیت خالص نماتد با استفاده از روش بلندر و هیپوکلرید سدیم بررسی و سوسپانسیون تخم و لارو سن دوم نماتد تهیه گردید. (Taylor & Netscher 1974, Hussey & Barker 1973).

برای تهیه جمعیت خالص نماتد *P. loosi*، تعدادی نمونه خاک و ریشه از باغات آلوده چای استان گیلان جمع آوری شد. جداسازی نماتدها از ریشه، بر اساس روش کولن و دهرد صورت گرفت (Coolen & D'Herde, 1972). کشت و تکثیر نماتد در شرایط آزمایشگاه طبق روش دیسک هویج انجام شد (Moody *et al.* 1973).

در مورد نماتد *A. besseyi*، ابتدا بذرهای آلوده از مناطق کشت برنج دراستان گیلان جمع آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در آب خیسانده و استخراج به روش کولن و دهرد انجام گرفت (Coolen & D'Herde 1972). برای تکثیر نماتد، از کشت قارچ *Alternaria alternata* روی محیط PDA استفاده گردید (Jamali *et al.* 2008; Wu *et al.* 2016).

۲) استخراج DNA

DNA ژنوم نماتدهای مورد مطالعه از سنین مختلف لاروی و نماتدهای بالغ ماده و نر برای نماتد مولد زخم ریشه *P. loosi* و نماتد نوک سفیدی برنج *A. besseyi* و لارو سن دوم و ماده بالغ برای نماتد مولد گره ریشه *M.incognita* و طبق دستورالعمل، با کیت Genomic DNA Isolation شرکت سیناژن استخراج شدند. سپس از آغازگرهای دژنره اختصاصی T/C)GTIAT(T/C/A)GTIG 5'(TA A(T/C)TGGCA)3' ENG1 و 5'(GTICC(R) TA(Y) TCIGTIAC(R) AA)3' ENG2 برای تکثیر ژن بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز در نماتدهای مورد مطالعه استفاده شد (Rosso *et al.* 1999, Uehara *et al.* 2001, Fu *et al* 2012, Fanelli *et al.* 2014). واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گردید. مخلوط واکنش شامل مقدار ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR buffer، مقدار ۰/۵ میکرولیتر ۱۰mM dNTP، پرایمر رفت و برگشت هرکدام یک میکرولیتر، DNA ۴ میکرولیتر، یک میکرولیتر از Mgcl2، ۰/۲۵ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA Polymerase (محصول شرکت سیناژن) و مقدار آب مقطر دوبار استریل ۱۴/۷۵ میکرولیتر بود. این واکنش با استفاده از دستگاه ترموسیکلر مدل (Thermal cycler 312- TC- techne) انجام گردید. برای نماتدهای *M .incognita* و *P. loosi* با شرایط دمایی و زمانی واکنش شامل مرحله واسرشته سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه، ۴۰ چرخه شامل واسرشته سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت سی ثانیه، اتصال آغازگرها به DNA ژنومی در ۵۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و تکثیر DNA در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه بود. در انتها، مرحله

بسط نهایی قطعات در۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه به کار برده شد (Rosso *et al.* 1999, Uehara *et al.* 2001). برای نماتد *A.besseyi* برنامه دمایی و زمانی واکنش شامل مرحله واسرشته سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت سی ثانیه، اتصال آغازگرها به DNA ژنومی در ۴۷ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و تکثیر DNA در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه بود. در نهایت، مرحله بسط نهایی قطعات در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه در نظر گرفته شد (Fu *et al.* 2012).

۳) استخراج RNA

به منظور استخراج RNA کل، از مرحله فعال لارو سن دوم نماتد مولد گره *M. incognita* و برای نماتد مولد زخم چای *P.loosi* و نماتد نوک سفیدی برنج *A.besseyi* از کلیه‌ی مراحل رشدی نماتد استفاده شد. بدین منظور جمعیت بسیار بالا (حدود تقریبی ده تا پانزده هزار نماتد) از هر گونه مورد استفاده قرار گرفت. نماتدها در یک میلی‌لیتر از محلول RNX-PLUS با استفاده از Tissue lyser QIAGEN به مدت ۵ دقیقه هموژنایز شده سپس به مدت ده ثانیه ورتکس و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و نمونه‌ها به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شدند. پس از اینکه نمونه‌ها ۱۵ دقیقه روی یخ خشک باقی ماندند، مخلوط حاضر به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با سرعت ده هزار دور در دقیقه (به کمک سانتریفیوژ یخچال‌دار) سانتریفیوژ شد. فاز رویی نمونه‌ها به میکروتیوب دیگری منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ خشک قرار گرفت. سپس در دمای ۴ درجه سیلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ده هزار دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی نمونه‌ها دور ریخته شد و مقدار ۱ میلی لیتر اتانول ۷۵ در صد به هر یک از نمونه‌ها اضافه گردید. سپس ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و با سرعت ۸۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی نمونه‌ها دور ریخته و فاز ته نشین به مدت ۵ پنج در دمای اتاق قرار داده شد تا خشک شود. نهایتا مقدار ۵۰ میکروتیوب آب مقطر دوبار تقطیر استریل به نمونه‌ها افزوه شد و نمونه‌ها برای ساخت cDNA در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. RNA استخراج شده، مورد بررسی کمی (تعیین غلظت) Nanodrop Spectrophotometer قرار گرفت (Sambrooke *et al.* 2000, Puissant & Houdebine 1991).

٤) ساخت cDNA

ساخت cDNA توسط کیت سنتز cDNA شرکت فرمنتاز SIGMA-ALDREICH cDNA Synthesis صورت پذیرفت. با مخلوطی از ۴ میکرولیتر، Reaction buffer 5x، ۲ میکرولیتر Ribolock، ۲ میکرولیتر dNTP 10mM، ۱ میکرولیتر Revert Aid، ۱ میکرولیتر پرایمر Oligo-dT و ۱۱ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل و مقدار ۱ میکرولیتر از RNA ساخته شده به مخلوط اضافه و در دستگاه ترموسایکر قرار داده شد و ساخت cDNA انجام گرفت. بعد از ساخت cDNA، جهت اطمینان از صحت ساخته شدن cDNAهای مورد آزمایش، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در دو مرحله با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن مرجع 18s F (TTAACAGAGACAAACGGGGG) و R (AGTTGGCATCGTTTACGGTC) برای هریک از نمونه‌ها انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با حجم

جدول۱. آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در qRT-PCR برای تکثیر ژن‌های هدف.

Table 1. Specific primers used in qRT_PCR for replication of target genes.

Nematode Species	Primer	Annealing Temperature	Primer Sequences Seq (5'…….3')	Length of PCR Products
M. incognita	Me	58 58	F:AGGGGTAATTATTTGAGAGAGGGT R: CGGCAACGACTTTTTCGTGA	268
P. loosi	Pra	57 57	F: TATGTGCTYGTGGATTGG R: CCGGCGTARMGTGCA	300
A. besseyi	Aph	59 59	F: ATACTCAGCAGGACCGACTT C R: ATGTCGCTCCTTCCATTCCA	218

نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گردید. مخلوط واکنش شامل مقدار ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR buffer ۱۰X، مقدار ۰/۵میکرولیتر dNTP mM ۱۰، پرایمر رفت و برگشت هرکدام ۰/۵ میکرولیتر، CDNA یک میکرولیتر، ۰/۷۵ میکرولیتر Mgcl2، ۰/۲۵ میکرولیتر از Taq DNA Polymerase (محصول شرکت سیناژن) و آب مقطر دوبار استریل ۱۹ میکرولیتر در نظر گرفته شد. این واکنش به کمک دستگاه ترموسیکلر مدل (Thermal cycler 312- TC- techne) انجام گرفت.

۵) بررسی بیان ژن با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی Real time PCR (qRT-PCR)

جهت بررسی بیان ژن بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی (Real-time qRT-PCR)، در مرحله نخست پرایمرهای اختصاصی هر یک از ژن‌های مورد مطالعه در هر نماتد و به کمک نرم-افزار ® AlleleID7 طراحی شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی با استفاده از کیت Maxima SYBR Green/ROX QPCR شرکت فرمنتاز انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۰/۸ میکرولیتر از cDNA، ۶/۲۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش qPCR، ۰/۵ میکرولیتر (غلظت ۱۰ میکرومول) از هر یک از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) و ۳/۳ میکرولیتر آب DEPC مخلوط به حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس نمونه‌های آزمایش به چاهک مخصوص دستگاه Real time PCR (Roche LightCycler 96) منتقل شد. برنامه تکثیر با شرایط دمایی۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس (فعال‌سازی ابتدایی آنزیم) و ۳۹ تکرار با چرخه‌های ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس (واسرشت شدن) ۴۵ ثانیه در دمای ۵۷-۵۸-۵۹ (دمای Tm آغازگر)، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس (بسط ترکیبی) و ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای بسط نهایی انجام شد. ژن مرجع 18s rRNA به عنوان کنترل داخلی، در این پژوهش استفاده شد. هر واکنش در سه تکرار انجام شد. اندازه‌گیری کمی بیان نسبی ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ (Livak & Schmittgen 2001) و معادله‌های ۱ و ۲ انجام شد.

معادله‌ی۱: $Ratio=2^{-\Delta\Delta Ct}$

معادله‌ی۲: Ct= (Ct target- Ct refrence) Control- (Ct ΔΔtarget- Ct refrence) treatment

٦) بررسی فعالیت آنزیم بتا- ۱ و ٤ گلوکاناز

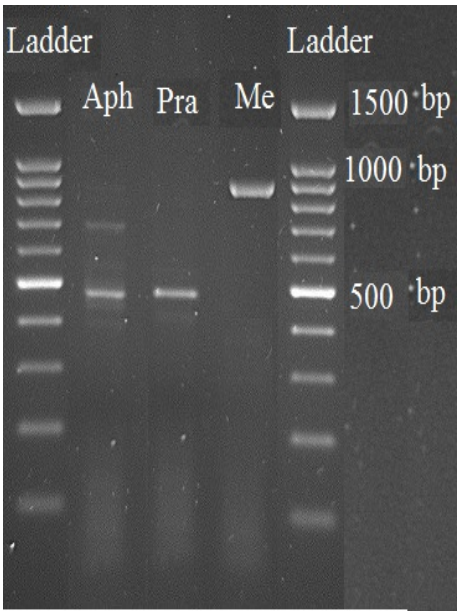
بررسی فعالیت آنزیم بتا- ۱ و ۴ گلوکاناز به روش توندج و همکاران همراه با اعمال تغییرات جزئی صورت گرفت (Tondje *et al.* 2007) . مخلوط واکنش شامل ۲۵۰

میکرولیتر محلول یک درصد کربوکسی متیل سلولز بود که در بافر استات سدیم ۰/۰۵ مولار تهیه شده و مقدار ۲۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی (تعداد تقریبا برابر از گونه‌های نماتد مورد مطالعه براساس وزن نماتدها در داخل میکروتیوپ و توزین آنها، سپس با مقدار مساوی آب مقطر استریل مخلوط شد و با استفاده از دستگاه Tissue lyser QIAGEN به مدت ۳ دقیقه هموژنایز شده و بعد از آن به مدت ۱ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با سرعت ده هزار دور در دقیقه به کمک سانتریفیوژ یخچال‌دار، سانتریفیوژ شد. فاز رویی نمونه‌ها به میکروتیوب دیگری منتقل شد) با یکدیگر مخلوط شدند. مخلوط واکنش (۵۰۰ میکرولیتر) برای مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب ۵۰ درجه سلسیوس نگهداری و سپس با اضافه کردن ۶۰۰ میکرولیتر معرف DNS و قرار دادن مخلوط واکنش در آب جوش به مدت پنج دقیقه، متوقف گردید. سپس حجم مخلوط واکنش با آب مقطر به دو میلی لیتر رسانده شد. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Varian Cary 100 Conc) جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و منحنی استاندارد بر اساس غلظت‌های مختلف گلوکز ترسیم گردید. دستگاه اسپکتروفوتومتر برای هر نمونه به وسیله مخلوط واکنش که عصاره آن در حمام آب۱۰۰ درجه سانتیگراد فعالیتش متوقف شده بود، صفر گردید. فعالیت اختصاصی آنزیم به صورت میلی گرم گلوکز آزاد شده در دقیقه به ازای میلی گرم پروتئین کل موجود در عصاره مشخص گردید.

$$\text{mg/ml} = \frac{\text{OD of sample}}{\text{OD of standard}}$$

۷) اندازه‌گیری میزان پروتئین کل

سنجش پروتئین با روش لوری و همکاران (Lowry *et al.* 1951) به کمک کیت آزمایشی (Ziestchem Diagnostics) و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد تعیین شد. مقدار جذب آن با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌ریدر (Microplate Reader) در ۵۴۵ نانومتر خوانده شد.



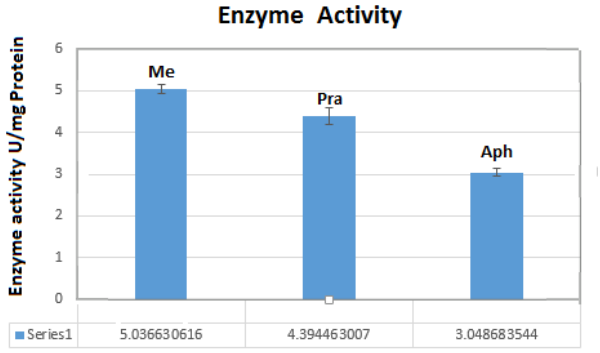
شکل۱.تفاوت نقوش محصول پی سی آر با آغازگر اختصاصی ENG1 و ENG2 در *M. incognita* (Me); *P. loosi* (Pra); *A. besseyi* (Aph).

Figure 1. Amplification of putative β-1,4 glucanase in *M. incognita* (Me); *P. loosi* (Pra); *A. besseyi* (Aph) using a pair of degenerate primer.

نتایج

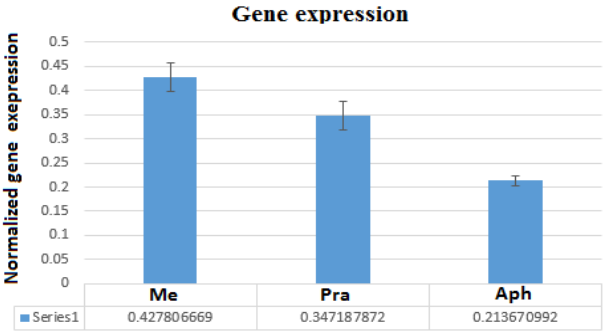
۱- تکثیر و ردیابی ژن بتا- ۱ و ٤ اندوگلوکاناز DNA ژنومی

جفت آغازگرهای اختصاصی دژنره‌ی ENG1 و ENG2 در واکنش زنجیره ای پلیمراز DNA ژنومی، قطعات ژنی با اندازه مورد انتظار ژن بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز را در هر سه گونه نماتد مورد مطالعه تکثیر کردند (شکل ۱). طول قطعات DNA تکثیر شده برای



شکل۲. مقایسه میانگین فعالیت آنزیمی گونه‌های مختلف (براساس میلی گرم گلوکز آزاد شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین یا U/mg protein) Me: *M. incognita*; Pra: *P. loosi*; Aph: *A. besseyi*

Figure 2. Mean comparison of enzyme assay in nematodes species (released glucose milligram in minute in milligram protein or U/mg protein) Me :*M.incognita*; Pra: *P.loosi*; Aph: *A.besseyi*



شکل ۳. میزان بیان ژن بتا- ۱ و ٤ اندوگلوکاناز در گونه‌های مختلف نماتد شکل *M. incognita* :Me; *P. loosi* :Pra; *A. besseyi* :Aph

Figure 3. Gene Expression rate of β-1,4 endoglucanase in nematodes species (released glucose milligram in minute in milligram protein or U/mg protein) Me:*M.incognita*; Pra: *P.loosi*; Aph: *A.besseyi*

نماتد *M. incognita* ۸۴۰ bp، در نماتد *P. loosi* ۴۹۰ bp و *A. besseyi* ۴۷۰ bp بوده است.

۲- شدت فعالیت آنزیم بتا- ۱ و ٤ اندوگلوکاناز

فعالیت آنزیم به صورت واحد آنزیمی در میلی‌گرم پروتئین کل تعیین شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز در نماتد *M. incognita* با ۵/۰۳ U/mg protein و پس از آن در نماتد *P .loosi* با ۴/۳۹ U/mg protein و کمترین مقدار فعالیت آنزیم در نماتد *A. besseyi* با ۳/۰۴ U/mg protein مشاهده شد (شکل ۲).

۳- بیان ژن بتا- ۱ و ٤ اندوگلوکاناز

پس از استخراج RNA و ساخت cDNA، ناحیه‌ی ژن مسئول بیان ژن بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) در هر گونه نماتد تکثیر شد. بیشترین بیان ژن بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز در نماتد مولد گره *M. incognita* و بعد از آن در نماتد مولد زخم *P. loosi* و کمترین بیان در نماتد نوک سفیدی برگ برنج *A. besseyi* مشاهده شد (شکل ۳).

بحث

در نماتدهای انگل گیاهی، سلولازها توسط خانواده‌های ژنی متعدد کدگذاری می‌شوند. شناسایی مراحل تکاملی این ژن، به درک تکامل نماتدهای انگل کمک قابل توجهی نموده است. نتایج این مطالعه در مورد ژن کد کننده آنزیم بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز در سه نماتد بیماری‌زای مهم، نشان داد که بیان و فعالیت آنزیم در نماتد مولد گره، بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده است. با توجه به این‌که این نماتد دارای طیف میزبانی وسیع و قدرت بالای بیمارگری می‌باشد، نتیجه بدست آمده دور از انتظار نیست. این میزان در مرحله لارو سن دوم و نماتد ماده بالغ حداکثر مقدار خود را دارا است. نتایج بدست آمده از این پژوهش همسو با نظر دیگر محققین می‌باشد. به گونه‌ای که جداسازی cDNA بدست آمده از ژن کد کننده آنزیم مورد

مطالعه و آنالیز بیان آن در گونه *M. incognita* مؤید این مطلب می‌باشد (Rosso *et al.* 1999) . همچنین اندازه گیری بیان (qRT-PCR) ژن بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز در شش سطح مقایسه‌ای در نماتد Linford & Oliveria *Rotylenchulus reniformis* 1940 نشان داد که بیشترین مقدار بیان در مرحله لارو سن دوم و بعد از آن در مرحله نماتدهای بالغ فعال است که گواهی بر فعالیت بیشتر ژن بتا-۱ و ۴ اندوگلوکاناز در مراحل نفوذ و حرکت نماتد *R. reniformis* می‌باشد و کمترین میزان بیان ژن کد کننده آنزیم مذکور در مرحله نماتد ماده بالغ ساکن بوده است. برای گونه‌های پارازیت داخلی ساکن، بیشترین مقدار آنزیم بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز در مرحله Preparasite یا مرحله ابتدای فعالیت لارو سن دوم و قبل از نفوذ به داخل میزبان است، زمانیکه که لاروها برای تغذیه و نفوذ نیازمند فعالیت بالای آنزیم هستند (Wubben *et al.* 2010). در سال ۲۰۰۶، ژن جدیدی به نام *MI-ENG-2* در *M. incognita* یافت شد که توسط خانواده گلیکوزیل هیدرولاز ۵ (GHF5) کد می‌شود. فعالیت بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز ناشی از ژن *MI-ENG-2* در شرایط آزمایشگاهی مورد تأیید قرار گرفت. رونویسی و ترجمه این ژن در غدد ترشحی مری لاروسن دوم (مرحله آلوده کننده) نشان داد که *MI-ENG-2* در تخریب دیواره سلولی حین پارازیتیسم نقش دارد (Ledger *et al.* 2006). بر اساس تحلیل Mass-spectrometry ترشحات *M. incognita*، تعداد کل پروتئین‌هایی که در روند بیماری‌زایی شرکت دارند، حدود ۵۰۰ پروتئین برآورد شده است. بررسی ژنوم نشان داد که نماتدهای غیرانگل فاقد ژن تولیدکننده آنزیم سلولاز هستند (Bellafiore *et al.* 2008).

نماتد مولد زخم ریشه چای، رتبه دوم را در میزان فعالیت آنزیم و بیان ژن رمزگذاری آن دارا بود. رفتار تغذیه‌ای این نماتد انگل داخلی مهاجر بوده و با تخریب دیواره بین سلولها در بافت کورتکس ریشه حرکت نموده و از طریق سازوکارهای مکانیکی و شیمیایی (ترشح آنزیم)، موجب ایجاد زخم گسترده روی ریشه می‌شود. قوی بودن استایلت در این نماتد، به پررنگ شدن بعد مکانیکی تخریب و جبران کمبود آنزیم در مقایسه با نماتد مولد گره، کمک نموده است. نتایج مطالعات سایر محققین نیز بیانگر ارتباط بین تغذیه و بیان آنزیمهای مترشحه درنماتدهایی با رفتار تغذیه‌ای مشابه می‌باشد. به عنوان مثال در *Radopholus similis,* (Cobb, 1893) Thorne, 1949 یا نماتد حفار، چهار ژن مختلف بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز شناسایی شده است. بررسی semi-quantitative RT-PCR این ژن‌ها نشان داد که این ژن‌ها دارای الگوی توسعه‌ای متفاوتی در مراحل مختلف رشدی نماتد بوده‌اند. به طوریکه سه ژن از چهار ژن شناسایی شده، در نماتدهای نر نسبت به نماتدهای ماده، از کاهش بیان برخوردار بوده‌اند. علت این رخداد، عدم تغذیه نماتدهای نر و غیر بیماری‌زا بودن آنها قلمداد شده است. بیشترین مقدار بیان این ژن‌ها در نماتدهای ماده بالغ و لاروهای سن دوم به ثبت رسید. این نکته به حرکت و فعالیت بیماری‌زایی بیشتر نماتدهای ماده مربوط دانسته شده است (Haegeman *et al.* 2008) . در مقایسه انجام شده بین نماتدهای ماده *H. glycines* و *R. similis* ، هیچ ژن بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز در نماتد سیستی ردیابی نشد. دلیل این امر، عدم تحرک و ساکن بودن این نماتد در این مرحله از بیماری‌زایی می‌باشد (Smant *et al.* 1998).

کمترین میزان بیان و فعالیت آنزیم در بین سه نماتد مورد مطالعه، مربوط به نماتد نوک سفیدی برگ برنج بوده و این نماتد انگل خارجی مهاجر است. فو و همکاران در سال ۲۰۱۲ رابطه بین سطح بیان ژن بتا- ۱ و ۴

اندوگلوکاناز و شدت علائم بیماری‌زایی را گزارش کردند. مطالعه تفاوت بیان ژن بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز در نماتد *Aphelenchoides fragariae* Ritzema Bos در سه سطح تغذیه‌ای (fungus-diet: FD) نماتدهای که روی قارچ *Clyndrocladium* spp. برای مدت طولانی کشت داده شدند، (plant-diet :PD) نماتدهای انگل که از گیاه جدا شدند و (diet-changed :DC) نماتدهایی که تغییر رژیم غذایی داشته و در ابتدا از گیاه جدا شده و بعد برای پنج نسل روی قارچ‌ها تکثیر شدند، نشان داد که بیشترین بیان ژن بتا- ۱ و ۴ اندوگلوکاناز مربوط به نماتدهای جدا شده از گیاه با رژیم غذایی PD بوده و بعد از آن نماتدهای DC قرار داشتند. نکته جالب اینکه در نماتدهای FD هیچ بیانی از ژن مذکور دیده نشد (Fu *et al.* 2012). بنابراین شاید بتوان پائین بودن بیان ژن مورد مطالعه در نماتد نوک سفیدی برگ برنج را به رفتار قارچ خواری در کنار انگل گیاهی بودن آن، مرتبط دانست.

منابع

Bellafiore S., Shen Z.X., Rosso M.N., Abad P., Shih P. and Briggs S.P. 2008. Direct Identification of the *Meloidogyne incognita* Secretome Reveals Proteins with Host Cell Reprogramming Potential. Plos Pathogen. 4(10): 1-12.

Bridge J., Plowright R. A. and Peng D. 2005. Nematode parasites of rice. In: Luc. M, R.A. Sikora and J. Bridge. (Eds.), Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. 2nd ed., CABI Publishing,Wallingford, UK. pp 87-130.

Coolen W.A. and D'Herde, C. J. 1972. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent Agri. Res. Cent., Belgium, 77p.

Curtis R.H.C. 2007. Plant parasitic nematode proteins and the host-parasite interaction. Briefings in Functional Genomics and Proteomics 6: 50-58.

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., Haegeman A. and Kikuchi T. 2011. Degradation of the plant cell wall by nematodes. In Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. 225-272.

Doyle E.A., and Lambert K.N. 2002. Cloning and characterization of an esophageal-gland-specific pectate lyase from the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. Molecular Plant-Microbe Interaction 15:549-556.

Fanelli E, Troccoli A., Picardi E., Pousis C. and De Luca F. 2014. Molecular characterization and functional analysis of four b-1,4-endoglucanases from the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus*. Plant Pathology 63: 1436-1445.

Fu Z, Agudelo P. and Wells CE. 2012. Differential expression of a β-1, 4-endoglucanase induced by diet change in the foliar nematode *Aphelenchoides fragariae*. Phytopathology 102 (8): 804-811.

Gao B.L., 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.

Goellner M, Smant G., De Boer J.M., Baum T.J. and Davis E.L. 2000. Isolation of β-1,4 endoglucanase genes from *Globodera tabacum* and their expression during parasitism. Nematology 32: 154-165.

Haegeman A., Jacob J., Van Holme B., Kyndt T. and Gheysen G. 2008. A family of GHF5 endo-1,4-β-glucanases in the migratory plantparasitic nematode *Radopholus similis*. Plant Pathology 57: 581-590.

Hussey R. S. and Barker K. R. 1973. Comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease Reporter 57:1025-1028.

Jabbari H., Niknam G., Tanha Maafi Z., Elashry A. and Grundler F.M.W. 2018. Identification of some putative parasitism effectors of *Heterodera cruciferae*, Franklin, 1945 on cabbage. Iranian Journal of Plant Pathology 53(3):287-302.

Jamali S., Pourjam E., Alizadeh A. and Alinia F. 2008. Reproduction of white tip nematode (*Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942) in different monoxenic cultures. Agricultural Science and Technology 10: 165-171.

Kikuchi T., Jones J.T., Aikawa T., Kosaka H. and Ogura N. 2004. A family of glycosyl hydrolase family 45 cellulases from the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. FEBS Letters 572: 201-205.

Ledger T.N., Jaubert S., Bosselut N., Abad P. and Rosso M.N. 2006. Characterization of a new β-1,4-endoglucanase gene from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and evolutionary scheme for phytonematode family 5 glycosyl hydrolases. Gene 382: 121-128.

Livak K.J. and Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2−11CT method. Methods 25: 402-408.

Long H., Peng D., Huang W., Peng H. and Wang G. 2013. Molecular characterization and functional analysis of two new b- 1,4-endoglucanase genes (Ha-eng-2, Ha-eng-3) from the cereal cyst nematode *Heterodera avenae*, Plant Pathology 62: 953-960.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.

Moody E.H., Lownsbery B.F. and Ahmad J.M. 1973. Culture of the root- lesion nematode *Pratylenchus vulnus* on carrot discs. Nematology 3: 225-226.

Muturi J., Gichuki C., Waceke J.W. and Runo S.M. 2010. Use of isoenzymes phenotypes to 22 characterize the major root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) parasitizing indigenous leafy vegetables in Kisii, 12th 23 KARI Biennial Scientific Conference, Kenya, Kenya 24 Agricultural Research Institute, Kenya, pp. 605-612.

Puissant C. and Houdebine L. 1991. An improvement of the single step method of RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate Phenol chloroform Extraction. Bio-Techniques 8: 148-149.

Rosso M. N., Favery B., Piotte C., Arthaud L., De Boer J. M., Hussey R. S., Bakker J., Baum T. J. and Abad P. 1999. Isolation of a cDNA encoding a β-1,4-endoglucanase in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and expression analysis during plant parasitism. Molecular Plant-Microbe Interactions 12: 585-591.

Sambrooke J., Frritsch EF.and Manitis T. 2000. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor laboratory press. Cold Spring Harbor, N.Y. Chapter 7 pp: 1-77.

Seraji A., Pourjam E., Safaie N. and Maafi Z.T. 2010. Effect of tea root lesion nematode (*Pratylenchus loosi*) on tea quality in Iran. The 4th International Conference on O – CHA (Tea) Culture and Science, 26 -28 October, Shizuoka, Japan.

Smant G., Stokkermans J.P.W.G., Yan Y.T., De Boer J.M., Baum T.J., Wang X.H., Hussey R.S., Gommers F.J., Henrissat B., Davis E.L., Helder J., Schots A. and Bakker J. 1998. Endogenous cellulases in animals: Isolation of β-1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. Procceding of National Academy Science of the USA 95: 4906-4911.

Taylor D.P. and Netscher C. 1974. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. Nematologica 20: 268-269.

Tondje P.R., Roberts D.P., Bon M.C., Widmer T., Samuels G.J., Ismaiel A., Begoude A.D., Tchana T., Nyemb-Tshomb E., Ndoumbe-Nkeng M., Batman R., Fontem D. and Hebbar K.P. 2007. Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameron. Biological Control 43: 202-212.

Uehara T., Kushida A. and Momota Y. 2001. PCR-based cloning of two β-1,4-endoglucanases from the root-lesion nematode *Pratylenchus penetrans*. Nematology 3: 335-341.

Wubben M.J., Callahan F.E. and Scheffler B.S. 2010. Transcript analysis of parasitic females of the sedentary semi-endoparasitic nematode *Rotylenchulus reniformis*. Molecular and Biochemical Parasitology 172: 31-40.

Wu G.L., Kuo T.H., Tsay T.T., Tsai I.J., Chen P. J. 2016. Glycoside Hydrolase (GH) 45 and 5 Candidate Cellulases in *Aphelenchoides besseyi* Isolated from Bird's-Nest Fern . PLoS ONE 11(7): DOI:10.1371.