

تألیف : آندریاس فون تیدمان و فالکو فلد مان

بیوتکنولوژی – موتورنوآوری در گیاه پزشکی



ترجمه: دکتر فیروز ابراهیم نسبت

Translator: Dr. Firoos Ebrahim-Nesbat

جلد هشتم از
سلسله انتشارات انجمن گیاه پزشکی آلمان
(German Phytomedical Society Series)

بیوتکنولوژی – موتورنوآوری در گیاه پزشکی

تألیف :

آندریاس فون تیدمان و فالکو فلد مان

Andreas von Tiedemann & Falko Feldmann

ترجمه:

Translator

دکتر فیروز ابراهیم نسبت

Firous Ebrahim-Nesbat

مقدمه مترجم

انجمن گیاه پزشکی آلمان، انجمنی غیرانتفاعی و غیرسیاسی، متشکل از کارشناسان بیماری های گیاهی در رشته های قارچ شناسی، ویروس شناسی و باکتری شناسی، متخصصین حشره شناسی و دفع آفات، کارشناسان محیط زیست و رشته های وابسته به آن ها در گیاهان زراعی و جنگلی است.

انجمن گیاه پزشکی آلمان در سال 1965 درین تأسیس شد و به تصویب رساندن اساسنامه خود رسماً به فعالیت پرداخت. اتحادیه گیاه پزشکان آلمان که از اکتبر 1949 تشکیل شده بود در سال 1969 به این انجمن پیوست. از وظایف اصلی این انجمن کمک به سالم نگاه داشتن گیاهان زراعی و باغی، آموزش علم گیاه پزشکی در دانشگاه ها و همکاری با سازمان های کشاورزی و حفظ نباتات، مشاورت با مقام های سیاسی در تدوین قوانین حفظ نباتات در آلمان و اتحادیه اروپا، و نظارت بر کنترل باقیمانده سموم در مواد غذایی و آب و پیش برد علم گیاه پزشکی در خدمت به مردم است. از مجموعه فعالیت های آن ها می توان به برگزاری کنگره های گیاه پزشکی، تبادل اطلاعات علمی و تخصصی و انتشار نشریاتی در زمینه های مهم علم گیاه پزشکی را نام برد. کنگره گیاه پزشکی که در سال 2004 در هامبورگ تشکیل شده بود جلد هفتم سلسله انتشارات خود را تحت عنوان :

Gesunde Pflanzen – Gesunde Nahrung, Pflanzenschutz ist Verbraucherschutz

که به وسیله این قلم با عنوان : گیاه سالم – تغذیه سالم، حفظ نباتات یعنی ایمنی مصرف کننده، ترجمه و با تصویب شورای انتشارات سازمان آموزش، ترویج و فناوری کشاورزی در دست چاپ می باشد.

در پنجاه پنجمین کنگره گیاه پزشکی که در شهریور 1385 (September, 2006) در گوتینگن تشکیل شد، هشتمین نشریه انجمن گیاه پزشکی آلمان تحت عنوان بیوتکنولوژی، موتور نوآوری در گیاه پزشکی (Biotechnologie – Innovationsmotor den Pflanzenschutz) منتشر شد

این کتاب به شرح تولید گیاهان زراعی به روش مهندسی ژنتیک پرداخته و به خطرات آن ها توجه نموده، مزایا و معایب کاشت گیاهان تغییر ژن یا تراژن را با اطلاعات موجود شرح داده است.

گیاهان تراژن معرفی شده مقاوم به علف کش ها، حشرات زیان آور، قارچ های بیماری زا و سایر عوامل بیمارگر خاکزاد می باشند. روش های مدرن تشخیص و اثبات یافته ها، توجه به تحول پیشرفتن ماشین های خودکار دفع آفات، برنامه ریزی و کاربرد این ماشین ها به کمک ماهواره و برنامه های رایانه ای از دیگر مطالب این کتاب است. کاربرد این فناوری به درستی موتور نوآوری در گیاه

پزشکی است که موجب کاهش مصرف علف کش ها، حشره کش ها و قارچ کش ها خواهد بود و به سالم نگه داشتن محیط زیست کمک خواهد رسانید. باروش های مدرن بیوتکنولوژی، مواد بسیارغنی غذائی و مواد جانبی فرآورده های غذائی مانند ویتامین ها و طعم های طبیعی از موجودات آبی و میکروارگانیزم های دریا پی بسرعت تجزیه، تشخیص ودراختیارتولید کنندگان مواد غذائی قرار داده می شود. تشخیص آلودگی آب، تجزیه باقی مانده سموم کشاورزی درمواد غذائی، تشخیص ژن های مقاوم درگیاهان بومی ازدیگرکاربرد های فنآوری زیستی است که دراین کتاب به آن ها اشاره شده است زیرا تکثیر، ترجمه، تهیه میکروفیلم وذخیره یا ایجاد هرگونه تغییرات توسط سیستم الکترونیکی دراصل این کتاب که به زبان آلمانی می باشد، درانحصارانتشارات اویگن اولمر است، ترجمه این کتاب به فارسی توسط این قلم با کسب امتیازرسمی ترجمه به تاریخ بیستم نوامبر 2006 توسط آقای گرد فریدریش، رئیس نشریات فنی و انتشارات اویگن اولمر، آغازگردید.

امیدوارم توانسته باشم با این قدم کوچک، دانشجویان و دست اندرکاران گیاه پزشکی و سازمان های اجرائی و تحقیقاتی را درجریان پیشرفت های به روز فنآوری زیستی قرار داده و این خدمت مورد قبول علاقه مندان قرار گرفته باشد. ازمنتقدین و پیشنهاد دهندگان برای کارهای آتی قبلا سپاسگزاری می کنم. با وجود کهولت سن و فاصله گرفتن ازتحولات ادبی نوشتاری درایران امیدوارم اشتباه ها را برمن خرده نگیرند و برای رفع آنها مرا مورد حمایت خود قراردهند.

ازآقای دکترکرامت الله ایزد پناه استاد و رئیس انستیتوی ویروس دانشگاه شیراز بخاطر ویراستار فنی و نوشتاری بخش ویروس و ازخانم نازنین زمانی نورکارشناس ارشد گیاه پزشکی و کاندیدای دکترا دردانشگاه گوتینگن بخاطر ویراستار نوشتاری این ترجمه صمیمانه سپاسگزارم

آلمان – گوتینگن فوریه 2007 مطابق اسفند 1385 شمسی

دکتر فیروز ابراهیم نسبت

پیشگفتار

یکی از قسمت های مهم راهبردی گیاه پزشکی، کاربرد صحیح علوم پایه ای برای حفظ گیاهان در مقابل عوامل زیان آور زیستی و غیر زیستی است. حفظ نباتات یکی از عمده ترین پایه های مدرن تولیدات گیاهی است که انگیزه آن افزایش تولید سالم با کیفیت بالا می باشد. این وظیفه، یک خواسته اصولی و مهم مردم از اهمیت وجودی گیاه پزشکان در جامعه است. قدم های متحول و پیشرفته سال های اخیر در زمینه بیوتکنولوژی امکانات وسیعی را در آینده به توسعه گیاه پزشکی بوجود می آورد. متخصصین حفظ نباتات اغلب از روش های پزشکی نظیر سنجش سرولوژیکی الایزا (ELISA)، واکنش زنجیرهای پلی مرآز (PCR) راهبردهای تحقیقاتی مواد مؤثره و انتقال ژن در اصلاح وراثتی گیاهان زارعی، در تحقیقات کشاورزی استفاده می کنند. نیازمندی ها و خطرات فنآوری زیستی در کشاورزی در مجامع رسمی در مقایسه با پزشکی به صورت دیگری ارزشیابی می شود. ارزشیابی بی طرف آنه و استفاده از امکانات واقعی بیوتکنولوژی در سایه ی بحث های ناشی از خطرات احتمالی آن قرار گرفته است.

شناساندن نوآوری بیوتکنولوژی در گیاه پزشکی، انگیزه نگارش هشتمین جلد از سلسله انتشارات انجمن گیاه پزشکان آلمان است. در سخنرانی های افتتاحیه پنجاه و پنجمین کنگره گیاه پزشکی آلمان تحت عنوان بیوتکنولوژی – موتور نوآوری برای گیاه پزشکی، فرصتی مناسب برای بررسی عمیق تر بیوتکنولوژی در سپتامبر 2006 در شهر گوتینگن بود. انگیزه ما، جلب توجه و نگاه عمیق به امکاناتی است که بیوتکنولوژی در کشاورزی لازم دارد. این کوشش روشن خواهد کرد که پیشرفت در حفظ نباتات زیستی در مبارزه با ویروس ها، قارچ ها، حشرات و علف های هرز، در تشخیص و توسعه سموم و مواد مؤثره بسیار متفاوت، وسیع تر و پیشرفته تر است. مخالفت ها ئی که به صورت رسمی در بسیاری از موارد با آن می شود مربوط به برنامه های آینده و یا در مورد وضعیت بررسی های اولیه علمی است.

یک نکته را باید از عان داشت و آن افزایش دانش تجربی مخصوصا در مورد شناسائی تأثیر متقابل بین گیاه و عوامل بیماری زاء، ارگانیزم های همراه و ترکیبات آن ها است که امکانات غیر قابل سنجش فراوانی مانند استفاده از سیگنال های بیوشیمی، فعال کردن ژن های خاموش، مواد مؤثره طبیعی برای دفع آفات را برای حفظ نباتات پنهان کرده اند، که وسعت آن ها در سال های آینده بسیار افزوده خواهد شد.

بتاریخ سپتامبر 2006

آندریاز فون تیدمان

رئیس اول – انجمن گیاه پزشکی آلمان

و

فالکو فلدمان

مدیر – انجمن گیاه پزشکی آلمان

فهرست مندرجات

- 4 پیشگفتار
- 6 فنآوری زیستی در گیاه پزشکی
استفان واگنر و فالکو فلدمان (Stefan Wagner & Falko Feldmann)
- 22 استفاده از بیوتکنولوژی در دفع آفات بیولوژیکی
رالف- اودو اهلرس (Ralf-Udo Ehlers)
- 40 گیاهان متحمل به علف کش ها – مصرف و آینده این گیاهان
برن وارد مرلندر و آندریاز فون تیدمان
(Bernward Märländer & Andreas von Tiedmann)
- 56 گیاهان تراژن مقاوم به ویروس – مکانیزم و امکانات استفاده از آن ها
مارک واررلمان (Mark Varrelmann)
- 81 گیاهان تراژن مقاوم به حشرات در اروپای غربی : وضع و آینده آن ها
یواخیم موزر (Joachim Moeser)
- 94 کاربرد مهندسی ژنتیک در بهبود گیاهان زراعی مقاوم به قارچ های بیماری زا
دیتمار جی اشتال، کلاوس اشמיד و راینارد نهلس
(Dietmar J. Stahl, Klaus Schmidt & Reinhard Nehls)
- 107 گرایش وزمینه های تحقیقات قارچ کش های مدرن
تیم آنک و اکارد تینز (Timm Anke & Eckhard Thines)
- 120 روش های مدرن تشخیص و اثبات یافته ها
پتر کارلوسکی (Petr Karlovsky)

فناوری زیستی در گیاه پزشکی

استفان واگنر و فالکو فلدمان

Stefan Wagner¹ & Falko Feldmann²

¹Institut für Pflanzenschutz im Gartenbau, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig (s.wagner@bba.de)

²Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft e.V., Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig (dpg@bba.de)

پیشگفتار

فناوری زیستی، کلید فناوری قرن بیست و یکم و چشم انداز آینده کشاورزی، فرآیند مواد غذایی، پزشکی و فناوری محیط زیست را امکان پذیر می کند.

در سال 2001 در سراسر دنیا، بیش از 2000 میلیون یورو در فناوری زیستی سرمایه گذاری شده است. از این مبلغ 70% از طرف بخش خصوصی و فقط 30% آن سرمایه گذاری بخش دولتی بود (Traxler, 2004). وضعیت شرکت های بازرگانی آلمان در امور فناوری زیستی با توجه به قدمت آن ها (80% شرکت ها بعد از سال 1995 تأسیس شده اند) قابل توجه است. فروش 480 شرکت بخش فناوری زیستی رقمی بیش از 1.5 میلیارد یورو در سال 2005 بوده است. بودجه تحقیقاتی که در اختیار آن ها قرار گرفته، در حدود 700 میلیون یورو بوده است. تخصیص این بودجه تحقیقاتی به شرکت ها (به 65% شرکت ها) سرمایه گذاری نامطمئن (venture capital) نامیده می شود که از طرف دولت فدرال آلمان، استان ها و از منابع محلی به عنوان کمک های تشویقی به شرکت های بیوتکنولوژی داده می شود (به 35% شرکت های بیوتکنولوژی BMBF, 2006). در حدود 10% شرکت های بیوتکنولوژی سرمایه خود را در بخش های ویژه تولیدات کشاورزی به کار می برند. غیر از آن بیشتر شرکت ها (در حدود 35%) با روش های تحقیقات اختصاصی خود مشغول به فعالیت هستند که کاربرد فراتری دارد و این نشان میدهد که از بیوتکنولوژی در حل راه کارهای دیگری هم می توان استفاده کرد.

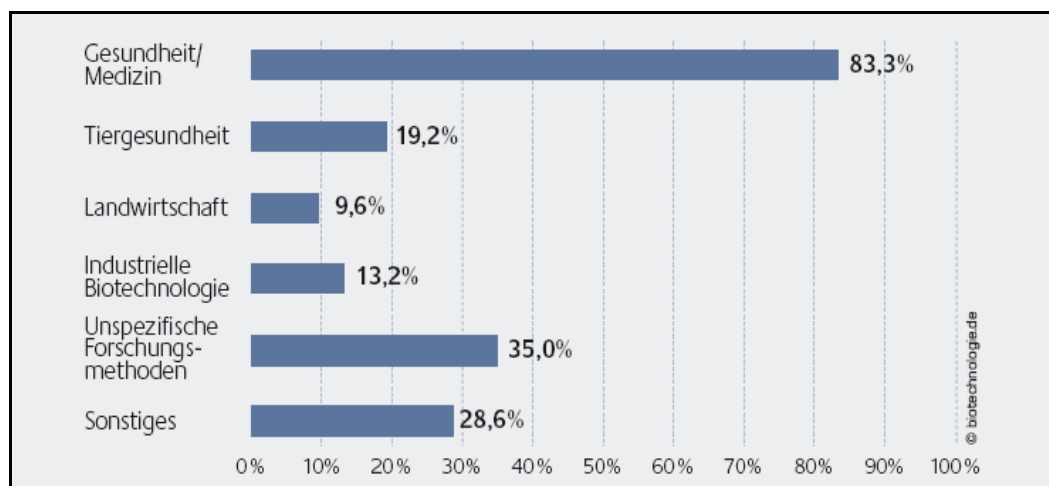
تمام شرکت های فناوری زیستی که در تولیدات کشاورزی کار می کنند، روش های خود را با هدف تهیه گیاه سالم به کار می برند و یا هدفی را دنبال می کنند که وظایف حفظ نباتات را بهبود می بخشد و باعث افزایش صفات بهینه گیاه از نظر فیزیولوژی تغذیه می شود.

انجام روش های فنآوری زیستی به وسیله انسان از بیش از 8000 سال پیش به کاررفته است اما از سال 1919 اولین بار به وسیله دانشمند مجارستانی مهندس کارل ارکی (Karl Ereky) اصطلاح بیوتکنولوژی به کار برده شد و آن را به این عنوان شرح داد: « بیوتکنولوژی مجموعه ی تمام راه کارهایی است که مواد خام را تا تولید با کمک میکروارگانیسم به انجام برساند ». بعد از آن تعریف های متعددی از بیوتکنولوژی به عمل آمد که گویای راه کارهای امروزی آن است .

اتحادیه فنآوری بیوتکنولوژی اروپایی (EFB) از اواخر دهه 1970 در مورد تعریف عمومی بیوتکنولوژی به توافق رسیدند که طبق آن فنآوری زیستی به 5 بخش تقسیم می شود:

- سبز: فنآوری زیستی در کشاورزی شامل تغییرات وراثتی گیاه و میکروارگانیسم
- قرمز: فنآوری زیستی شامل پزشکی و داروسازی، تولید داروهای شفابخش و داروهای تشخیص بیماری
- آبی: فنآوری زیستی شامل تهیه مواد جانبی فرآورده های غذایی گرفته شده از دریا
- سفید: فنآوری زیستی شامل تولیدات براساس فنآوری زیستی و روند صنعتی مواد شیمیایی، پارچه و صنعت مواد غذایی
- خاکستری: فنآوری زیستی شامل روند بیوتکنولوژی در بخش اقتصاد زباله زدائی، تصویه آب و رفع آلودگی خاک

فنآوری زیستی یک نوع فنآوری خاص است که ریشه در تمام رشته های تحقیقاتی دارد و علاوه بر زمینه های گیاه پزشکی سهمی در پزشکی، شیمی، فیزیک، فنآوری اطلاعاتی و علوم ماده ای دارد.



شکل 1 - بخش های مختلف فناوری زیستی و درصد فعالیت شرکت های آلمانی در سال 2005

- بهداشت و پزشکی	83.3%
- بهداشت دامی	19.25%
- کشاورزی	9.6%
- فناوری صنعتی	13.2%
- تحقیقات نامعمول	35%
- فناوری های دیگر	28.6%

در این بحث، تعریف جامعه اروپا (OECD) را که در سال 1989 برای سه بخش فناوری سنتی، فناوری زیستی مدرن و فناوری مولکولی و وراثتی تعیین کرده اند، به کار خواهیم برد (BMBF, 2001). در این بخش از یک سو مثال های استفاده از بیوتکنولوژی در گیاه پزشکی مانند روش ها و راهبرد های تحقیقاتی، و از سوی دیگر استفاده از تولیدات زیستی موجود چه به صورت کالا، خدمات، فرایند و یا راهبردهای پیچیده فناوری زیستی. انگیزه ما شرح دادن این راهبردها نیست، بلکه استفاده از امکانات گسترده آن ها در گیاه پزشکی می باشد. برای مطلع شدن از تک تک راهبرد ها لطفا به مقالات اصلی مراجعه شود.

بیوتکنولوژی سنتی در گیاه پزشکی

بیوتکنولوژی سنتی، مهم ترین کاربردهای فناوری تولیدات میکروارگانیسم و موجودات پیشرفته تر مانند حشرات و نماتد ها را شامل می شود. درمبحث نباید اهمیت فناوری سنتی را هم تراز با غیرمدرن بودن آن قرارداد، بلکه مربوط به فناوری هائی است که درستی آن ها در عمل آزمایش شده است. افزایش اطلاعات درمورد فناوری زیستی باعث افزایش تولید انبوه میکروارگانیسم ها و تولید متابولیسیم های وابسته به آن ها شده است. کارهای تحقیقاتی پایه ای درمورد زیست شناسی آفات و تأثیرمتقابل آن ها با محیط زیست، ورود آن ها را به تولیدات بیوتکنولوژی همواری سازد. حفظ نباتات بیولوژیکی یا دفع آفات با مواد طبیعی، از مثال های بارز بیوتکنولوژی هستند. از میکروارگانیسم ها یا بصورت مستقیم و یا از متابولیسیم های تولید شده توسط آن ها استفاده می شود.

در مبارزه بیولوژیکی با آفات روزبه روز کاربرد آنتاگونیست ها در مبارزه با آن ها مخصوصا در مبارزه با آفات درختان میوه افزوده می شود (Ehlers, 2006 ; Richter et al. 2006). مبارزه با آفات می تواند با آنتاگونیست های حیوانی (*Trichogramma spp.*, *Chrysoperla spp.*,) و یا آنتاگونیست های قارچی (*Amblyseius spp*) و یا با سایر آنتاگونیست های میکروبی (*Pseudomonas spp.*, *Bacillus subtilis* , *Serratia spp.* ,) انجام شود. (*Xenorhabdus bovienii*)

تعدادی از شرکت های شیمیائی موفق شده اند حشره کش های بیولوژیکی را براساس قارچ های بیماری زا درحشرات (entomopathogenic fungi) ازجنس های *Beauveria*، *Metharhizium* و *Verticillium* را ساخته و وارد بازارکنند. همچنین می توان ویروس ها را در دفع آفات زیستی به کاربرد. درباغ داری های اکو (eco farming) از ویروس (*Granulosevirus= CpGV*) به صورت موفقیت آمیزی برای مبارزه با کرم سیب (*Laspeyresia pomonella*) استفاده می شود. برای مبارزه با لاروهای آفت کلم (*Mamestra brassicae*) نیز از ویروس *eulenpathogenen Baculovirus* (MbmNPV) که بیماری زا در آفت کلم است، استفاده می شود (Cory et al. 2005). از ویروس ها یا به صورت مستقیم استفاده می شود، یا پس از تهیه ترکیب بیوتکنولوژی ارگانیزم، مورد استفاده قرار می گیرند. به تناسب طبقه بندی سموم دفع آفات زیستی، می توان ارگانیزم های فعال یا مواد تولید شده آن ها را مانند سموم دفع آفات شیمیائی طبق مقررات تعیین شده در صدور مجوز استفاده از آن ها، به کاربرد. مقررات صدور مجوز برای سموم دفع آفات زیستی شبیه سموم دفع آفات شیمیائی می باشد. در نظر است مواد تقویتی گیاهان هم برای استفاده مورد کنترل و آزمایش قرار گیرد (www.bvl.bund.de).

از معروف ترین تولیدات دفع آفات زیستی- شیمیائی، زهرابه باکتری *Bacillus thuringiensis* به نام بی- تی (Bt-Toxin) است. این زهرابه که از اسپرو کریستال های پروتئین باکتری مذکور تهیه می شود در 40 سال گذشته به عنوان حشره کش زیستی در دفع آفات واحد های کشاورزی و باغداری باروش اکو و در عملیات مبارزه با آفات در جنگل به کار رفته است (Schuler et al. 1998). زهرابه تولید شده توسط این باکتری برای لارو بعضی از پروانه ها که از برگ تغذیه می کنند خاصیت کشندگی دارد اما بر سایر موجودات محیط زیست بی تأثیر است. از دیگر انواع حشره کش های زیستی، می توان به عصاره قسمت های مختلف گیاه *Azadirachta indica* اشاره کرد. تأثیر این عصاره بدین صورت است که از خوردن برگ ها توسط لارو پروانه جلوگیری می کند و به عنوان حشره کش در دفع آفات

زیستی برای مبارزه با پروانه ها و کنه ها به کار می رود و سبب افزایش دفاع طبیعی در باغ ها و مزارع می شود.

در 20 سال گذشته تحقیقات زیادی در مورد اثربیوشیمیایی و دارویی گیاه *Azadirachta indica* انجام شده است (Schmutterer, 1995).

سایر مواد طبیعی مانند مواد طبیعی قارچ ها پایه های مهم دفع آفات شیمیایی را تشکیل می دهند. برای مثال استروبیلورین Strobilurine بعنوان ماده اصلی به کار می رود و ماده مؤثره آن با سنتز تغییر داده می شود تا سبب افزایش اثرگذاری آن گردد. عصاره پیرتروم Pyrethrum که از آن ماده مؤثره پیرتروئید Pyrethroide به دست می آید کاربرد حشره کشی دارد. از ماده مؤثره آورمکتین Avermectin علیه کنه ها از ماده مؤثره اسپینوزاد Spinosad علیه پروانه ها، بدون این که تغییری در آن ها داده شود، مستقیماً به کار می رود (Stetter & Lieb 2000).

از فرمون ها Pheromon که با فنآوری زیستی تهیه شده اند، برای مبارزه با سوسک های خانواده ی *Scolytidae*، آفت پروانه ای انگور (*Lobesia spec.*, *Eupoecilia spec.*)، سوسک سیب زمینی (*Leptinotarsa decemlineata*) و آفت پروانه ای بلوط (*Cameraria ohridella*) استفاده می شود. نقش فرمون ها برای به اشتباه انداختن حشرات جهت جذب آن ها به سمت سم است. مخلوطی از فرمون ها با یک سم شیمیایی که نقش جذب و کشندگی را دارد، در دفع آفات مورد استفاده قرار می گیرد (Meyhöfer et al. 2006).

بین دفع آفات شیمیایی و دفع آفات زیستی، ایجاد مقاومت اکتسابی در گیاهان قرار دارد (Stahl et al. 2006) که فون چستر (Von Chester) آن را در سال 1933 بعنوان «مصونیت» برای حفظ نباتات مفید دانسته است. امروزه کاربرد این اصل در دفع آفات زیستی با استفاده از راهبردهای بیوتکنولوژی و افزایش دانش در رابطه میزبان و عوامل بیماری زا بهتر شده است.

در مقاومت اکتسابی بدون این که مجبور بشوند در ژنوم گیاه حساس تغییری بدهند، مقاومت طبیعی آن را فعال می کنند. این فرآیند بدو صورت انجام می شود (Pieterse & Van Loon, 1999). در صورت اول مقاومت سیستمیک SAR (Systemic Acquired Resistance) از طریق میکروارگانیزم هائیکه ایجاد زخم می کنند و یا از طریق مواد شیمیایی ایجاد می شود. در نوع دوم مقاومت اکتسابی سیستمیک ISR (Induced Systemic Resistance) در اثر نفوذ میکروارگانیزم های پیرامون ریشه، نظیر ریزوباکتری های افزایش دهنده ی رشد PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) و یا مایکوریزاها (Mycorrhiza) ایجاد می شود (Feldmann & Lieberei, 1991; Durrant & Dong 2004). در اثر فعال شدن قدرت دفاعی گیاه، از قدرت بیماری زایی عوامل بیماری زا کاسته شده یا متوقف می شود، در نتیجه از کاهش محصول و از کاهش کیفیت آن

جلوگیری می گردد. مقاومت اکتسابی ایجاد شده در گیاه به صورت سیستمیک به سایر قسمت های گیاه که تیمار نشده اند، پخش می شود و مقاومت آن قسمت ها را نیز افزایش می دهد. چگونگی انتشار این اختار یا سیگنال ها (signal) در گیاه و ترکیب مواد اختاری (signal material) در گیاه، از پروژه های تحقیقاتی بسیاری از دانشمندان است. در این تحقیقات ایجاد مقاومت اکتسابی (SAR) در گیاهان آزمایشی مدل مانند *Arabidopsis*، *Nicotiana* و *Lycopersicum* با استفاده از اسید سالیسیلیک (salicylic acid = SA) سری زنجیری سیگنال (signal chain)، فعال می شود. در آزمایش دیگری فعال شدن و هدایت سیگنال که منجر به ایجاد مقاومت اکتسابی سیستمیک (ISR) می شود از طریق اسید سالیسیلیک صورت نمی گیرد بلکه هدایت سیگنال احتمالاً به وسیله یاسمونات (jasmonate) یا اتیلن انجام می شود (Conrath et al. 2002).

از دیگر انواع فعال شدن مکانیزم مقاومت، واکنش فرا حساسیت (= hypersensitive Reaction) و ضخیم شدن موضعی دیواره سلولی است. از دیگر انواع فعال شدن مکانیزم مقاومت، فعال شدن سنتز پروتئین ها می باشد پروتئین های ناشی از فعالیت عوامل بیماری زا در گیاه مانند فیتوآلکسین ها (Phytoalexine) و پروتئین های پی - آر (PR- Proteine) یا سایر پروتئین های تشکیل دهنده واکنش دفاعی مانند PAL (Phenylalanin-Ammonium-Lyase) که روند ایجاد مکانیزم مقاومت را همراهی می کنند (Pieterse & van Loon, 1999).

انتقال این اطلاعات از تحقیقات پایه ای به صنعت منجر به تهیه مواد تقویت کننده گیاه با فناوری زیستی شده است (مانند Bion®, Oryzenat®) که مورد استفاده فناوری همزیستی (symbiont) قرار گرفته است (مانند INOQ®).

میکروارگانیزم های متحول شده یا همزیست با گیاهان با عملیات تخمیری و در شرایط آزمایشگاهی (in vivo) به صورت انبوه تکثیر می شوند (Feldmann & Grotkass, 2002) و در محلی از آن ها استفاده می شود که از نظر شرایط کشت طبیعی کمبود آن ها محسوس است (Feldmann, 1998). تعداد زیادی از تولیدات و اقدامات که برای کاربرد ویژه، توسعه و گسترش یافته اند در بازارهای بین المللی عرضه می شود (von Alten et al. 2002).

فعال کردن دائمی مواد فعال کننده در گیاه، از طریق وارد کردن ژن های لازم برای سنتز، احتمالاً طیف حفاظتی دیگری را در گیاه بوجود می آورد (این اقدامات نسبت به تیمار مستقیم مواد به روی گیاه، صدمه کمتری به رشد گیاه می رساند) کاربرد مواد نیر جزء راه برد های بیوتکنولوژی مدرن می باشد.

بیوتکنولوژی مدرن در گیاه پزشکی

بیوتکنولوژی مدرن، رابطه بین بیوتکنولوژی سنتی را با پیشرفت های بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک به هم وصل می کند. مهندسی ژنتیک اغلب با فناوری زیستی اشتباه گرفته می شود. به صورت کلی تمام روش ها و پردازش ها برای جداسازی، تحقیق، تغییر و انتقال مواد وراثتی در نهایت قسمتی از بیوتکنولوژی را تشکیل می دهد. رابطه بین بیوتکنولوژی سنتی و مدرن مخصوصا در مورد اصلاح نباتات مدرن واضح تر می شود. اصلاح نباتات پایه اقتصادی و اقتصاد مناسب محیط زیست در کشاورزی است و با کاربرد گیاه پزشکی رابطه مستقیم دارد.

در 10 سال گذشته بیوتکنولوژی اصلاح نباتات جایگزین اصلاح نباتات سنتی « انتخاب و تلقیح » شد که از آن جمله می توان به اصلاح استحاله یا موتاسیون در گیاه، کشت سلول و بافت در محیط آزمایشگاه و ادغام پروتوپلاست ها باهم اشاره کرد. کاربرد این عملیات سبب به وجود آمدن تغییراتی در وراثت شد که با ظهور صفات جدید به ارقام جدید منتقل شدند (Dickmann et al. 1999).

تشخیص مولکولی ارقام جدید و مواد مورد اصلاح با بیوتکنولوژی، تحقیقات اصلی اصلاح نباتات را پایه گذاری کرد. گسترش نشان های مولکولی، جایگزین نشان های بیوشیمی و مشخصات مرفولوژی گردید. تحقیق و توسعه نشان (marker) های مولکولی برای شناسایی صفات ارزشمندی مانند مقاومت، اهمیت نشان ها را افزایش داد. در بعضی از پروژه های اصلاح نباتات نشان های تک ژنی و همچنین نشان های چند ژنی که صفات آن ها ارثی است، به کار برده می شوند، با این روش تسهیلاتی در انتخاب تلقیح صفات بوجود می آید و اثر انتخاب صفات افزایش می یابد (Wehling, 2000). روش های تجزیه مولکولی برای تشخیص ژن یا فرآورده های حاصل از آن پیشرفت های زیادی کرده است و در آینده بدون استثنا جزء روش های معمولی اصلاح نباتات خواهد بود.

کشت مریستیم، هاپلوئید های مضاعف از کشت میکرواسپرها، کشت جنین، کشت پروتوپلاست، نوب سلول ها (cell fusion) و همسانه سازی (Trigiano & Gray, 2004) از روش های فناوری زیستی هستند و در نهایت منجر به تغییرات صفات وراثتی می شوند. بعضی از این روند ها برای اصلاح ارقام در کشاورزی اکو بسیار مناسب می باشند. اصلاح نباتات با اصلاح و توسعه ارقام پرمحصول خدمت بزرگی را به کشاورزی انجام داده است. مسلما هنوز به حداکثر توانایی فیزیولوژیکی در اصلاح گیاهان پرمحصول و مقاوم به بیماری ها نرسیده است.

اصلاح نباتات با پردازش های ژنتیکی راه را برای نوترکیبی ژن ها بازمی کند که با تلقیح سنتی قابل انتقال نمی باشند یا این که به ژن های نا خواسته متصل نیستند. مهندسی ژنتیک بعنوان بیوتکنولوژی مدرن می تواند در رابطه با روش های سنتی که هزاران سال به کار رفته است به صورت دائم

گسترش پیدا کند و روند اصلاح و تولید را توسعه و تکمیل نماید (www.bafz.de). اختلاف روش های سنتی با روش های بیوتکنولوژی در این است که تغییرات اصلاح شده در روش سنتی زود تر و مؤثرتر وارد عمل می شود.

تثبیت تغییرات وراثتی در ژنوم های گیرنده و انتقال این تغییرات به نسل های بعدی، خواسته های علمی از مهندسی ژنتیک است (Ryschka et al. 2000). حجم حمایت مهندسی ژنتیک از یک هدف خاص در تولید ارقام کشاورزی بسیار ضروری می باشد. اما استفاده از این ارقام باید دلایل نحوه تصمیم گیری را برآورد کند.

اولین گیاه تراژن در سال 1983 تهیه گردید. یک دانشمند آمریکایی موفق شد ژن مقاوم به آنتی بیوتیک را از باکتری به گیاه توتون منتقل کند. در آلمان در سال 1989 اولین گیاه تراژن از طرف انستیتوی تحقیقاتی ماکس پلانک در کلن ارائه شد. گیاه تراژن گیاه اطلسی بوده که رنگ گلبرگ های آن تغییر داده شده بود. چهار سال بعد اولین گیاه زارعی یعنی چغندر قند تراژن که مقاوم به ویروس بود در آلمان اجازه کشت گرفت که اهمیت زیادی در سیستم تغذیه آینده دارد. در سال 1994، گوجه فرنگی تراژن (FlavrSavr-tomato) به عنوان اولین ماده غذایی، وارد بازار شد. غیر از آن تراژن های ذرت، سویا، منداب و گیاهان زیاد کشاورزی در سراسر دنیا اجازه کشت گرفتند (Saedler & Schuchert, 2001). انگیزه تغییرات ژنوم گیاه در کنار اصلاح گیاه برای پر محصولی، گیاه پزشکی و زمینه های حفظ نباتات مانند مقاومت در مقابل حشرات جونده (Moeser, 2006)، مقاومت در مقابل بیماری های قارچی (Stahl et al. 2006)، مقاومت در مقابل بیماری های ویروسی (Varrelmann, 2006) یا متحمل به علف کش های (Märlander & v. Tiedemann, 2006) مورد نظری باشد.

در حدود 40 ژن به گیاهان زارعی منتقل شده اند که برای مقاومت در مقابل حشرات **جونده** به کار می رود (www.biosischerheit.de). از معروفترین ژن ها، ژن های استخراج شده از باسیلوس تورینجینسز *Bacillus thuringiensis* به نام ژن های-بی - تی (Bt-gens) هستند. ده ژن به گیاهان زارعی منتقل شده اند که می توانند پروتئین های سمی در گیاه تولید کنند و بر علیه حشرات مختلف به صورت انتخابی تأثیرگذار هستند. این ژن های کد شده امکان تولید پروتئین سمی در خود گیاه را میسر می سازد و در مقابل حشرات جونده از خود مقاومت نشان می دهند. کرم ساقه خوار ذرت *Ostrinia nubilalis* مخصوصا در مناطق گرم، سبب کاهش تا 30% محصول می شود. لارو این پروانه سوراخی در ساقه ذرت ایجاد کرده و در درون ساقه زندگی می کند و به سختی می توان با سموم شیمیایی با آن مبارزه کرد. ارقام ذرت مجهز به بی-تی، علاوه بر این که محصول آن ها کمتر کاهش می یابد، به قارچ های مضر نیز که در اثر زخمی شدن ساقه ذرت می توانستند ایجاد عفونت کنند کمتر آلوده می شوند و در ارقام ذرت مجهز به بی-تی زهرابه فوموزین Fumonisin که برای سلامتی انسان

خطرناک است تولید نمی شود. انواع گیاهان ذرت و پنبه که ژن بی - تی را برای حفاظت درمقابل حشرات جونده درخود دارند، در آمریکا و سایرکشورهای خارج ازاروپا درسطح وسیعی کاشته می شوند. درکشت ارقام پنبه که دارای ژن بی - تی هستند، کشاورزان توانسته اند درسم پاشی علیه آفات پنبه مانند کرم قوزه پنبه *Helicoverpa zea*، کرم سرخ پنبه *Pectinophora gossypiella* و *Heliothis virescens* صرفه جوئی کنند.

محققین و دانشمندان غیرازژن بی - تی، ژن های دیگری هم به گیاه وارد کرده اند وسبب مقاومت گیاه درمقابل حشرات شده اند. گروه ژن های بازدارنده آنزیم پروتئاز (Protease inhibitor) مهم ترین آن ها هستند. ژن بازدارنده آنزیم پروتئاز، ژن های خود گیاه هستند که سبب جلوگیری از عملکرد آنزیم پروتئاز حشرات مختلف می شوند اما تأثیری بر آنزیم پروتئاز گیاهی خودی ندارند (Blatter & Wolfe, 1995).

برای مقابله با بیماری های قارچی (Anke & Thines, 2006) مواد مختلف از جمله استفاده از آنزیم کیتیناز (Chitinase) مورد آزمایش می باشد. زیرا این آنزیم قادر است قند هائی از نوع پلی ساکارید در قارچ ها که در ترکیب دیواره سلولی وجود دارد، از بین ببرد. آنزیم کیتیناز به میسلیم های قارچ که به داخل سلول گیاه نفوذ می کنند، حمله کرده و از رشد قارچ جلوگیری می کند. برطبق این اصل کیتیناز و گلوکوناز جزء پروتئین های مربوط به واکنش گیاه (PR) (pathogenesis-related Protein) درمقابل عوامل بیماری زا می باشند که در اثر عفونت گیاه با یک بیماری قارچی در گیاه بوجود می آیند. این سیستم دفاعی خود گیاه خیلی کمتر مطالعه شده است و اگر هم بررسی هائی در این مورد انجام شده بسیار دیرتر شروع شده است. در اثر افزایش غلظت آنزیم های پی - آر به علت فعالیت عوامل بیماری زا سبب حفاظت گیاه درمقابل آن قارچ یا عامل بیماری زا می شود (Schulze-Lefert & Panstruga, 2003).

از گیاهان تراژن مقاوم درمقابل قارچ ها می توان به جو مقاوم به عفونت فوزاریوم اشاره کرد و از تولید زهرابه این قارچ جلوگیری می کند و همچنین به منداب تراژن مقاوم به عفونت قارچ *Rhizoctonia solani* اشاره کرد.

ژن های معروف به اسموتین (Osmotine) که می توانند غشا سلولی قارچ ها را از بین ببرند درگوجه فرنگی، سیب زمینی و توتون پیدا شده اند. اولین تجربه دراستفاده از این ژن ها درمورد قارچ فیتوفتورا *Phytophthora infestans* عامل پوسیدگی غده و گیاه سیب زمینی بود که سبب کند شدن ظهور علائم بیماری گردید. مثال دیگر استفاده از ژن های ریبونوکلئوآز (Ribonucleasgens) است که سبب از بین رفتن اسید نوکلئیک قارچ می شود و از گسترش قارچ در گیاه جلوگیری می کند (Zhu et al. 1996). انگیزه کاربرد ارقام مقاوم به قارچ ها، کاهش مصرف قارچ کش ها می باشد.

از ژن های مقاومی که تاکنون موفق شده اند از آنها همسانه سازی تهیه نمایند ایجاد مقاومت در مقابل قارچ های زیوا پرور یا بیوتروف ها (Biotroph)، مانند سفیدک حقیقی و قارچ های زنگ گیاهان هستند. البته این فرآیند که در ابتدا ساده به نظرمی رسید، بسیار پیچیده است. به صورت مثال در جو 2 دونوع از ژن های اصلی شناخته شده اند. ژن مقاوم و غالب ام-ال (MI)، که سبب ایجاد فرا حساسیت میزبان و مرگ سریع بافت می شود و ژن مقاوم ولی مغلوب ام-ال-او (mlo) است که مانع ورود عامل بیماری زا در سلولهای اپیدرمی جو می شوند. هر دونوع مقاومت از ژن های منفرد ساده مقاوم ناشی می شوند. نظریه هائی نشان می دهد که عملکرد این دو ژن مقاوم احتیاج به کمک ژن های دیگر دارند (Schulze-Lefert & Panstruga, 2003).

مبارزه با بیماری های باکتریائی مشکل است. برای مقابله با بیماری های باکتریائی سیستم دفاعی مولکولی بیشتر بر اساس ژن های پکتالیاز (Pektatlyase) و لیزوزیم (Lysozym) می باشد. فراوانی ژن های لیزوزیم بیشتر است و برای باکتری ها سمی هستند. در صورت موجود بودن در گیاه می توانند از تکثیر باکتری ها جلوگیری کنند. به صورت مثال ژنی از باکتری فاژ تی - 4 (Bacterophage T4) از عفونت ارقام سیب به باکتری *Erwinia amylovora* جلوگیری می کند یا در زراعت سیب زمینی آن را از عفونت به بیماری باکتریائی *Erwinia carotovora* که خاک را است، حفاظت می کند. در توتون ژن گذاشته شده که پپتید لیتیک Ceropin B lytic peptides از پروانه کرم ابریشم به دست می آید، سبب کاهش عفونت با باکتری *Pseudomonas solanacearum* در ساقه گردید اما در آلودگی ریشه مؤثر واقع نشد (www.biosicherheit.de).

در کشاورزی مشکل بزرگ را بیماری های ویروسی تشکیل می دهند زیرا نمی توان با آن ها با سموم دفع آفات مبارزه کرد، لذا سعی می شود با مهندسی ژنتیک گیاهان را در مقابل ویروس ها محافظت کرد. مهم ترین گروه ژن ها یا بخشی از توالی ژن ها که منشأ ویروسی بنام مقاومت مشتق شده از عامل از بیماری زا (PDR) است و خود ویروس (pathogen derived resistance) آن ها را تولید می کند (Stiekema et al. 1993). در بعضی موارد به علت وجود قسمت غیر بیماری زای ویروس در سلولهای گیاهی، ویروس ها قادر به تکثیر در گیاه نیستند. لذا سعی می شود با انتقال ژن ها که پروتئین پوششی ویروس یا پروتئین ترابری ویروس آن ها کد شده است، مقاومت در مقابل ویروس را افزایش دهند. این فناوری در چغندر قند علیه ویروس ریزومانیا (Rizomania-virus) که عامل بیماری ریشه ای چغندر است و در سیب زمینی علیه ویروس برگ قاشقی سیب زمینی (*Potato leafroll virus*) به کار برده می شود (Blatter & Wolfe, 1995). یکی دیگر از راه های ایجاد مقاومت (PDR)، انتقال ژن های ویروسی رپلیکاز (Replicase) یا قطعه ای از آن به گیاه است. این فناوری سبب جلوگیری از تکثیر ویروس در میزبان می شود اما چگونگی نحوه عملکرد آن کاملاً روشن نیست. این روش علیه

بسیاری از ویروس‌ها به کاررفته است. با مایه زنی گیاهان با اسید ریونکلئیک و ویروس‌های ساتالایت (Satellit RNA) از جدایه‌های کم آزار توانستند تحمل کلم را به مقدار زیادی در مقابل ویروس موزائیک کلم گل (*Cauliflower mosaic virus*) افزایش دهند. آزمایش‌ها نشان داد که تراختن ژن Satellit RNA هم گیاه را در مقابل عفونت حفظ می‌کند. واکنش کاربرد Satellit RNA نسبت به نوع ویروس و گیاه فرق می‌کند (Blatter & Wolfe, 1995). در ارقام تراژن نیازی به سم پاشی علیه حشرات ناقل ویروس وجود ندارد.

غیراز آفات و بیماری‌ها، **علف‌های هرز** مشکل بعدی در کشاورزی هستند. رشد خارج از حد علف‌ها نسبت به رشد گیاهان زارعی، باعث کاهش تولید محصول می‌شوند. کاربرد علف‌کش‌ها که با هزینه بالایی انجام می‌شود، سبب آلوده شدن محیط زیست می‌شود. توسعه علف‌کش‌های انتخابی با طیف وسیع‌تر، به جای علف‌کش‌های توتال (total herbicide) و کاشت گیاهان تراژن که در رشد آنها این علف‌کش‌ها اثری ندارند، راهبرد جدیدی را در مبارزه با علف‌های هرز با تکنولوژی زیستی می‌گشاید. در این رابطه دوره کار دنبال می‌شود

- الف : در گیاه آنزیمی تولید می‌شود که می‌تواند علف‌کش‌ها را بی‌اثر کند مانند ترکیبات گروه آستیل (acetyl-group)

- ب : آنزیم به وجود آمده شبیه پروتئین علف‌کش است اما ساختمان پروتئین طوری تغییر داده شده که علف‌کش‌ها نمی‌توانند از فعالیت آن جلوگیری کنند (Kishore & Shaw, 1988 ; Dunke, 1999).

مهم‌ترین ماده مؤثره علف‌کش‌ها، گلیفوسات (Glyphosat) و گلو فوسینات (Glufosinat)، دو علف‌کش غیرانتخابی علیه‌های تراژن‌های متحمل به علف‌کش، در ارقام زراعی متعدد در سراسر دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرد. این مواد که با میکروارگانیزم‌ها در خاک بسرعت از بین می‌روند، می‌توان برای مبارزه با علف‌های نسل دوم موقعی به کاربرد که محصول را به خطری اندازند یا این که رشد آن‌ها پیشرفت بیشتری کرده است. در آمریکا گیاهان تراژن ذرت، سویا، چغندر قند، منداب که متحمل به علف‌کش‌ها هستند در سطح بسیار وسیعی کاشته می‌شوند. در راهبرد جدید مبارزه با علف‌های هرز طبق تجربه آمریکایی‌ها در مزارع با گیاهان متحمل به علف‌کش‌ها استعمال علف‌کش‌ها به مراتب کمتر از مزارع کاشت شده با گیاهان غیر تراژن است.

بیوتکنولوژی مولکولی

بیوتکنولوژی مولکولی شامل تحقیقات ژنوم (Genom Research)، ژنومیک فعال (Functional Genomics)، پروتئومیک (Proteomics)، ترانس کریپتومیک (Transcriptomics) و تشخیص مولکولی (Molecular Diagnostics) است (Karlovsky, 2006). روند کاری بیوتکنولوژی مولکولی از بیولوژی سلولی، بیولوژی مولکولی، بیولوژی ساختمانی، بیولوژی انفورماتیک و بیوفیزیک ناشی می شود. برای مطالعه رابطه بین میزبان و بیمارگر ناگزیر باید پروتئین ها را مطالعه کرد. برای مثال برای مطالعه پروتئین (proteomic) باید مستقیماً به بیماری زائی عوامل بیماری زا پرداخت (Xing *et al.* 2002). در نسخه برداری (transcription profiles) تحقیقات اصلاح نباتات مولکولی می توان بعد از وارد کردن ژن بیگانه و مشاهده تولیدات آن، تغییرات به وجود آمده را درطیف ژنی ثبت نمود (Talbot, 2004). با استفاده از روش اسپکترومتر از نوع میکروآرری (DNA-Micro-arrays) می توان بررسی کرد، تا چه اندازه یک ژن تحت شرایط خاصی نسخه برداری (transcribed) شده است. با مقایسه نسخه برداری بین سلول های گیاهی تراژن و سلول های گیاهی غیرتراژن می توان تفاوت بین این دو را تعیین کرد (Xing *et al.* 2002). تهیه توالی ژن sequencing و مطالعه نقش آن، اساس مکانیزم مولکولی است و می تواند توالی ژنوم گیاهی یا رابطه میزبان و بیمارگر را مشخص کند. اطلاعات به دست آمده از این گونه تحقیقات، دراستفاده های بیوتکنولوژی متعدد نظیر اصلاح نباتات مولکولی و یا تغییرات مهندسی ژن گیاهان کاربرد دارد (Caldenty & Barz, 2001). ساختمان ژن ها و تکرار توالی جفت های بازی و ترتیب قرارگرفتن آن ها، اساس بیوتکنولوژی سنتی و مدرن را تشکیل می دهد. برای مثال تهیه توالی قسمتی از DNA مربوط به ژنوم یا DNA مربوط به میتوکندری، اساس تشخیص مولکولی (Molecular Diagnostics) میکروارگانیزم را روشن می کند. متخصصین با ادغام روش تعیین باز بیولوژی مولکولی و روش واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)، آغازگرهای ویژه ای برای تعداد زیادی از میکروارگانیزم ها پیدا کرده اند. با گسترش روش های مختلف واکنش زنجیره ای پلی مرز مانند (Nested-PCR، Real-time PCR، DNA-Chips) می توان با کمترین مقدار DNA، به هویت میکروارگانیزم یا DNA پی برد (Alvarez 2004, Narayanasamy 2001). علاوه بر استفاده از کمترین مقدار نمونه، از مزایای دیگر این روش ها، سرعت و تعیین ویژگی خاص نمونه ها است. با پیدایش نوآوری های الکترونیک، وسایل تجزیه سیارو قابل حمل به وجود آمده است. با استفاده از نانوتکنولوژی اسپکترومترها ی سیارمی توان نمونه های گیاه پزشکی را در مزرعه و محل مورد نیاز بررسی کرد.

نوآوری بیوتکنولوژی رami توان هم دربررسی و تجزیه قسمت هائی از ژنوم و هم برای بررسی تمام ژنوم گیاه میزبان یا بیمارگر به کاربرد. در تجزیه ژنوم گیاهان سازمان های مختلف با هم همکاری دارند. به عنوان مثال می توان همکاری برنامه های وزارت فدرال برای آموزش و تحقیق آلمان (BMBF) و صنایع را نام برد (آنالیز کامل ژنوم در سیستم بیولوژی گیاهی «GABI»). اطلاعات به دست آمده از این همکاری ها، در اصلاح نباتات، مقاومت در گیاهان و همچنین در توسعه و پیشرفت تعیین صفات گیاهان به نام کشاورزی مولکولی (Molecular Farming) و طرح گیاهی (Designer Plant) با صفات و مشخصات جدید، مورد استفاده قرار می گیرد. با این برنامه ها قرار است در آینده، گیاهان تراژن را برای واکسیناسیون، داروسازی یا تهیه آنتی سرم برای انسان مورد استفاده قرار دهند (www.bio-pro.de). علاوه بر این، قرار است تغییراتی در متابولیسم گیاهی داده شود تا بازدهی آن ها بهتر شود مانند تغییر مقدار درصد روغن منداب و سویا یا تغییراتی در مقدار اسید آمینه ذرت (Functional Food).

چشم انداز آینده

برای کشور آلمان با تکنولوژی ممتاز در جهان پس از 20 سال پیشرفت در بیوتکنولوژی اینک شاهد تغییرات نامناسب در توازن استفاده از تکنولوژی اقتصادی، فناوری صنعتی و فناوری کشاورزی شده است لذا باید با برنامه های لازم جایگاه و موقعیت خود را در آینده حفظ کند.

پیشرفت مداوم در پرده های بیوتکنولوژی، شناسائی روزافزون از ساختمان سلولی موجودات و استفاده از تولیدات متابولیسم آن ها، سبب شده است تحقیقات پایه ای در سال های اخیر متحول گردد. کاربردهای بیوتکنولوژی در تولیدات گیاهی و فراورده های آن ها، راه خود را در استفاده از تکنولوژی زیستی پیدا کرده است و سهم مهمی در ادامه توسعه راهبرد های مدرن، دائمی و اساسی صنعت کشاورزی به عهده گرفته است. آینده نشان خواهد داد که باید روستاها را برای استفاده تولیدات جدید کشاورزی توسعه داد یا این که سطح زیرکشت کنونی را ثابت نگاه داشته و تولیدات جدید را دراز مدت بهینه سازی کرد. یکی از عوامل بهینه سازی، افزایش سطح دانش کشاورزان با انگیزه استفاده از ایده های نوآوری بیوتکنولوژی است.

دانشگاه های آلمان نقش مهمی را در این مورد ایفا می کنند. آنها نه تنها نبض پیشرفت های آینده را در دست دارند با تربیت پرسنل متخصص و مدیران شرکت های بیوتکنولوژی را در آینده تحویل جامعه می دهند، بلکه به صورت روزافزون آخرین دانش بیوتکنولوژی را برای شروع و تأسیس شرکت ها به صورت مؤثر به آن ها منتقل می کنند. نیازمندی های این شرکت ها از منابع عمومی با انگیزه

تشکیل شبکه مورد حمایت قرار می گیرد. این حمایت ها شامل کسب و توزیع اطلاعات، تقسیم کار در چارچوب این شبکه ها است. به علت ارتباط بی شمار فناوری زیستی با گیاه پزشکی و بنیان این فناوری، می توان فناوری زیستی را به درستی یک موتور نوآوری برای گیاه پزشکی نامید.

Literatur

- Alten, v. H., Blal, B, Dodd, J. C., Feldmann, F., Vosatka, M., 2002: Quality Control of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Inoculum in EuropEscherichia In: Gianinazzi, H., Schuepp, H., Barea, J.M., Haselwandter, K.: "Mycorrhiza Technology in Agriculture: from Genes to Bioproducts", Birkhäuser, Switzerland, 281-296
- Alvarez A.M., 2004: Integrated Approaches for Detection of Plant Pathogenic Bacteria and Diagnosis. Annual Review of Phytopathology 42, 339–66.
- Anke, T., Thines, ESCHERICHIA, 2006: Trends und Perspektiven moderner Fungizidforschung. Schriftenreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft EscherichiaV. 8, 92-103, ISSN 0939-8929. Eugen Ulmer KG, Stuttgart
- Blatter, R., Wolfe M.S., 1995: Die Verwendung molekularbiologischer Technologien zur Erzeugung von Wirtsresistenz gegen Schadenserreger: Mögliche Folgen bezüglich einer Anpassung der Krankheiten und SchädlingEscherichia Eidgenössische Technische Hochschule (ETH), Institut für Pflanzenwissenschaften.
- BMBF, 2001: Rahmenprogramm Biotechnologie – Chancen nutzen und gestalten – BMBF Publik 2001 <http://www.biotechnologiEscherichiade>
- BMBF, 2006: Biotechnologie-Firmenumfrage 2006. <http://www.biotechnologiEscherichiade>, 20.07.2006
- Chester, K. S., 1933: The problem of acquired physiological immunity in plants. Quart Rev Biol 8, 275-324.
- Conrath, U., Pieterse, C.M.J., Mauch-Mani, B., 2002: Priming in plant–pathogen interactions. Trends in Plant Science 7, 210- 216.
- Cory J. S., Green B. M., Paul R. K., 2005. Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. Journal of Invertebrate Pathology 89(2), 101-111.
- Diekmann, M., Hanke, V., Huancaruna-Perales, ESCHERICHIA Traxler, G., 1999: Advances in protoplast techniques for Malus and Prunus. Acta Horticulture 484, 571 – 577.
- Durrant W. ESCHERICHIA, Dong, X., 2004: Systemic Acquired ResistancEscherichia Annual Review of Phytopathology 42, 185–209.
- Ehlers, R.-U., 2006: Einsatz der Biotechnologie im biologischen Pflanzenschutz. Schriftenreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft EscherichiaV. 8, 17-31, ISSN 0939-8929. Eugen Ulmer KG, Stuttgart

- Feldmann, F., 1998: Symbiontenttechnologie in der Praxis: Arbuskuläre Mykorrhiza im Gartenbau. Thalacker-Medien, Braunschweig, ISBN 3-87815-109-8
- Feldmann, F., Grotkass, C., 2002: Directed inoculum production – shall we be able to design AMF populations to achieve predictable symbiotic effectiveness? In: Gianinazzi, H., Schuepp, H., Barea, J.M., Haselwandter, K.: "Mycorrhiza Technology in Agriculture: from Genes to Bioproducts", Birkhäuser, Switzerland, 261-279
- Feldmann, F., Lieberei, R., 1991: Mycorrhiza induced changes in the defence metabolism correlated with enhanced leaf resistance against pathogens. *Plant Physiol* 5, 874.
- Karlovsky, P., 2006: Moderne Diagnosemethoden und Nachweisverfahren. Schriftenreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft *EscherichiaV.* 8, 104-117, ISSN 0939-8929. Eugen Ulmer KG, Stuttgart
- Keen, N. T., 2000: A Century of Plant Pathology: A Retrospective View on Understanding Host-Parasite Interactions. *Annual Review of Phytopathology* 38, 31–48.
- Kishore, G.M., Shah, D.M., 1988: Amino Acid Biosynthesis Inhibitors as Herbicides. *Annual Review of Biochemistry* 57, 627 – 663.
- Lydon, J., Duke, S.O., 1999: Inhibitors of glutamine biosynthesis. In: Singh, B.K (ed.) *Plant Amino Acids*. Marcel Dekker, Inc., New York: 445-464.
- Märländer, B., Tiedemann, A. v., 2006: Herbizidtolerante Kulturpflanzen – Anwendungspotenziale und Perspektiven. Schriftenreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft *EscherichiaV.* 8, 32-45, ISSN 0939-8929. Eugen Ulmer KG, Stuttgart
- Meyhöfer R., Siekmann G., Klug T., Hommes M., 2006: Strategien zur Befallsreduzierung der Rosskastanien-Miniermotte im öffentlichen Grün: Informationen anlässlich des Statusseminars in der BBA Braunschweig, 9./10.2.2006. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes, in press.
- Michelmore, R.A., 1995: Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology* 33, 393-427.
- Moeser, J., 2006: Insektenresistente transgene Nutzpflanzen in Westeuropa: Status und Perspektiven. Schriftenreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft *EscherichiaV.* 8, 69-79, ISSN 0939-8929. Eugen Ulmer KG, Stuttgart
- Narayanasamy, P., 2001: *Plant Pathogen Detection and disease Diagnosis*, Second Edition. Series: Books in Soils, Plants, and the Environment, Volume 81, Taylor and Francis CRC Press.
- Oksman-Caldenty, K.-M., Barz, W.H., 2001: *Plant Biotechnology and Transgenic Plants*. Books in Soils, Plants, and the Environment, Volume 92, Taylor and Francis CRC Press.
- Pieterse, C.M.J., van Loon, L. C., 1999: Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science Reviews* 4, 1360 – 1385.
- Richter, ESCHERICHIA, Albert, R., Jaeckel, B., Leopold, D. 2003: *Encarsia formosa* – Eine Erzwespe für den biologischen Pflanzenschutz unter dem Einfluss von Insektiziden und wechselnden Wirten. Nachrichtenblatt des deutschen Pflanzenschutzdienstes 55(8), 161-172.
- Ryschka, U., Schumann, G., Klocke, ESCHERICHIA, Scholze, P., Krämer, R., 1999: Somatic cell hybridization for transfer of disease resistance in Brassica. In: Altman, A., Meira, Z., Shamay, I.(eds.). *Plant biotechnology and in vitro biology in the 21st*

- Century, Springer Verlag, 1999, pp. 205 - 208
- Saedler H., Schuchert, W., 2001: Biotechnologie in der Pflanzenproduktion. In: Heiden, S., Erb, R., Burschel, C. (ed.), Biotechnologie als interdisziplinäre Herausforderung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg,
- Schmutterer, H., 1995: The Neem Tree and Other Meliaceous Plants. Sources of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and Other Purposes. VCH Publishers Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, 696 pp.
- Schuler T. H., Poppy, G. M., Kerry, B., Denholm, I., 1998: Insect-resistant transgenic plants. *Tibtech* 16, 168 – 175.
- Schulze-Lefert P., Ralph Panstruga R., 2003: Establishment of Biotrophy by Parasitic Fungi and Reprogramming of Host Cells. *Annual Review of Phytopathology* 41, 641–67.
- Stahl, D. J., Schmidt, K., Nehls, R., 2006: Einsatz gentechnischer Methoden zur Verbesserung der Kulturpflanzenresistenz gegenüber parasitären Pilzen. *Schriftenreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft EscherichiaV.* 8, 80-91, ISSN 0939-8929. Eugen Ulmer KG, Stuttgart
- Stetter J., Lieb F., 2000: Innovation im Pflanzenschutz: Trends in der Forschung. *Angewandte Chemie* 112, 1792 – 1812.
- Stiekema, W.J., Visser, B., Florack, D.ESCHERICHIAA., 1993: Is durable resistance against viruses and bacteria attainable via biotechnology? In: Jacobs, T., Parlevliet J.ESCHERICHIA (eds.) *Durability of Disease Resistance*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp.71-82.
- Talbot, N., 2004: Plant-Pathogen Interactions: Annual Plant Reviews, Volume Eleven. Taylor and Francis CRC Press.
- Traxler, G., 2004: „Biotechnology in a complete system of plant genetic improvement: perspectives on developed and developing countries“ in: Renabio Conference, Salvador, 20 de agosto, 2004, 1-12.
- Trigiano, R.N., Gray, D.J. 2004: *Plant Development and Biotechnology*. Taylor and Francis CRC Press.
- Varrelmann, M., 2006: Virusresistente transgene Pflanzen – Mechanismus und Nutzungsmöglichkeiten. *Schriftenreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft EscherichiaV.* 8, 46-68, ISSN 0939-8929. Eugen Ulmer KG, Stuttgart
- Wehling, P., 2000: “Quality and breeding – Cultivars, genetic engineering“. In: B. Shewfelt, R. L. Bruckner (eds.) *Fruit and vegetable quality: An integrated view*. Technomic Publishing Co, 2000, 21-42.
- Xing, T., Ouellet, T., Miki, B.L., 2002: Towards genomic and proteomics studies of protein phosphorylation in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 7 , 224 – 230.
- Zhu, B., Chen, T.H.H., Li, P.H., 1996: Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein. *Planta* 198, 70 - 77.

استفاده از بیوتکنولوژی در دفع آفات بیولوژیکی

رالف اودو اهلرس

Ralf-Udo Ehlers

Institut für Phytopathologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Hermann-Rodewald-Str. 9, 24118 Kiel
(ehlers@biotec.uni-kiel.de)

امکانات دفع آفات بیولوژیکی

مدیریت اکوسیستم کشاورزی

اصول هر تولید کشاورزی چرخش طبیعی آن تولید است و در این چرخش تک تک ویژگی های آن تولید به صورت نامحدود بر یکدیگر تأثیر گذارند. همان طوری که هر گیاه زراعی مورد حمله آفات و بیماری های گیاهی قرار می گیرد که از سوی انسان ارگانیزم های زیان آور نامیده می شوند، ارگانیزم ها هم مورد حمله آنتاگونیست ها (antagonist) قرار گرفته و مورد تغذیه آنها قرار می گیرند. دفع آفات بیولوژیکی عبارت است از تنظیم جمعیت عوامل بیماری زا با کاربرد عوامل زیستی. استفاده از دفع آفات بیولوژیکی اغلب دست کم گرفته می شود. در مناطق کشاورزی وجود آنتاگونیست ها جزئی از فاکتورهای تولیدی خاک است. کاربرد غلط فناوری تولیدی می تواند توازن بین آفات مضر و حشرات مفید را به هم بزند و سبب عملیات گرانقیمت دیگری شود. به صورت مثال شخم و برگرداندن خاک مزرعه منداب زمستانی سبب کاهش پارازیت های طبیعی آن (مثلا *Phradis morionellus*) برای کنترل سوسک منداب (*Meligethes spp.*) می گردد (Nitzsche & Ulber, 1998). این آنتاگونیست ها لاروهای سوسک منداب را پارازیت می کنند و هم زمان با تکامل سوسک آن ها هم توسعه پیدا می کنند اما در سال بعد از بدن سوسک خارج می شوند. اگر لارو های پارازیت شده در عمق خاک دفن شوند تعداد کمی از آن ها می توانند در سال بعد خود را به روی خاک برسانند. علاوه بر سوسک ها، از جمعیت نماتدهای بیماری زای حشره (مانند *Steinernema spp.* و *Heterorhabditis spp.*) هم در اثر شخم عمیق کاسته می شود (Susurluk, 1991 ; Brust, 2005). نماتد ها می توانند فقط 10% جمعیت سوسک منداب را در سن شفیره گی کاهش بدهند (Nielsen & Philipsen, 2005). سوسک منداب در سطح مزرعه اصلا در دسترس نماتد ها قرار ندارد (Susurluk, 2005). به این ترتیب از توانائی آنتاگونیست ها کاسته می شود و عملیات سم

پاشی را ضروری می کند. درک ارتباط بهتر چگونگی چرخش زراعی با فناوری تولید کمک به صرفه جوئی در هزینه های کشاورزی می کند. ایجاد یک سیستم مدیریت کشاورزی اکو برای حفاظت از میکروارگانیزم های مفید، استفاده درست از توانائی آنتاگونیست را ممکن می سازد و سبب صرفه جوئی در عملیات سم پاشی شیمیائی می شود.

موارد استفاده دفع آفات بیولوژیکی از این قرار است:

- نگهداری و حمایت از آنتاگونیست ها (مدیریت کشاورزی اکو)
- افزایش حشرات مفید جدید (دفع آفات بیولوژیکی سنتی)
- جمع آوری و شناسائی گونه های پرآزار virulent (دفع آفات بیولوژیکی سنتی جدید)
- پخش متناوب آنتاگونیست ها در مزرعه (عملیات مبارزه و پیش گیری)

دفع آفات بیولوژیکی سنتی

بخش دیگری از دفع آفات بیولوژیکی توزیع آنتاگونیست ها برای تنظیم جمعیت ارقام مهاجم است. این روش را دفع آفات بیولوژیکی سنتی می نامند. آنتاگونیست های حشره ای و دشمنان بیماری زای آفات و علف های هرز، از مکان های بومی آن ها جمع آوری شده به صورت انبوه تکثیر و سپس در مناطق غیرسم پاشی شده که آفات و علف های هرز آن مشکل ساز شده اند، رها می سازند. این روش دفع آفات بیولوژیکی در کشورهای قاره آمریکا در بیش از 3 میلیارد هکتار کاربرد عملی دارد (این مقدار معادل تقریباً 10% سطح زیرکشت کشاورزی است) و هزینه نسبی این عملیات بسیار مناسب و مؤثر می باشد. برای مثال علف هرز *Chondrilla juncea* (Asteraceae) در سال 1872 اولین بار در آمریکای شمالی شناسائی و در 3.4 میلیون هکتار انتشار یافت. این علف هرز در استرالیا بدون داشتن آنتاگونیست خسارت زیادی به بار می آورد. برای مبارزه با این علف هرز از قارچ زنگ *Puccinia chondrillina* و پشه گالی *Cystiphora schmidti* با موفقیت استفاده شد (Julien & Griffith, 1999). نسبت صرفه جوئی مبارزه با این علف هرز در مقایسه با سایر روش ها یک به 112 (1:112) برآورد شد (Cullen, 1985). هزینه های دفع آفات بیولوژیکی سنتی را همیشه دولت پرداخته است زیرا خسارت ناشی از آن تنها به مزارع زیرکشت محدود نبوده بلکه تمام منطقه را تهدید کرده است. روش های فناوری زیستی در دفع آفات بیولوژیکی سنتی با انگیزه افزایش جمعیت آنتاگونیست ها در سطح بسیار وسیع، با هم ادغام می شوند.

تناوب پخش حشرات مفید

یکی دیگر از امکانات کاربردی دفع آفات بیولوژیکی پخش تعداد بیشماری از آنتاگونیست ها در مزارع کشاورزی و گلخانه ها برای مبارزه یا پیش گیری از آن ها است. کشاورز در مورد زمان پخش آنتاگونیست ها تصمیم می گیرد و باید هزینه اجرای آن را هم بپردازد. برای برآورد این گونه خواسته ها شرکت های متوسط و کوچک (KMUs) در 20 سال گذشته توسعه پیدا کرده اند که آنتاگونیست ها را تولید و به فروش می رسانند. در دهه هفتاد میلادی اولین بار یک شرکت هلندی به نام کوپرت (Koppert) با پرورش کنه *Phytoseiulus persimilis* و پارازیت *Encarsia formosa* برای مبارزه با مگس سفید (white flies)، شروع به فعالیت کرد. در دهه هشتاد میلادی یک شرکت بلژیکی (Biobest) اقدام به توسعه و تولید انبوه آنتاگونیست ها نمود و به صورت پودر در گلخانه ها پخش کرد. برای جلوگیری از توقف رشد آنتاگونیست ها، از سم پاشی در گلخانه ها جلوگیری شد و برای تقویت آنتاگونیست ها، حشرات مفید دیگری هم به آن ها اضافه شد. در حال حاضر بیش از 100 حشره مفید در اروپا به وسیله شرکت ها عرضه می شود. با 30 گونه از این حشرات می توان با کلیه آفات در گلخانه ها مبارزه کرد. بیش از 30 شرکت در اروپا با فروش بیش از 150 میلیون یورو فعالیت می کنند. بیش از 600000 از این حشرات مفید بارزش بیش از 30 میلیون یورو فروخته می شود. افزایش سالانه این تجارت بین 10 و 20% است (Frost & Sullivan, 2001).

راهبرد های پرورش حشرات مفید یک نقش مرکزی دارد. زیرا بازار عرضه حشرات مفید در اروپای شمالی به سمت اشباع می رود. لذا، به علت رقابت شرکت ها و امکان تولید انبوه، قیمت عرضه تنزل می کند و این قیمت ها است که سهم فعالیت بازار شرکت ها را تعیین می کند. فنآوری تهیه و پرورش حشرات مفید نیاز به ثبت ندارد، لذا اطلاعات فنآوری تهیه حشرات مفید شرکت های مختلف محرمانه می ماند. اخیراً تغذیه های مصنوعی برای حشرات به کار برده می شود تا قیمت تولید را پائین نگاه دارند (Grenier & Clercq, 2003) و بسته بندی بهتر سبب شده است که کیفیت کالا افزایش یابد (van Lentern & Tommasini, 2003). مهم ترین شرط پیشرفت این بازار در اروپا، اقتصاد آزاد و برچیده شدن گمرک کشورها برای ورود تولیدات اروپائی، و برقراری ترابری بهتر که بتواند کالا را در عرض 1-2 روز در تمام اروپا به مصرف کننده نهائی برساند، است.

استفاده از میکروارگانیزم ها در دفع آفات

در مقایسه با فنآوری تولید و استفاده از حشرات مفید، تولید و استفاده از ساخته های میکروبی در دفع آفات مراحل اولیه خود را طی می کند. تا دهه 80 میلادی مهم ترین ماده بیولوژیکی شناخته شده برای دفع

آفات بی - تی *Bacillus thuringiensis* (Bt) بود که 95% مجموع بازادفع آفات بیولوژیکی را به خود اختصاص میداد. امروزه وضعیت به نفع حشرات مفید تغییر کرده است. سهم سالیانه مصرف حشرات مفید در اروپا 55% و سهم سالیانه مواد میکروبی با کاهش چشم گیره 25% رسیده است. فروش مواد میکروبی با وجود کوشش و فعالیت تهیه کنندگان آن معادل 30 میلیون یورو در سال است که بیشترین آن مربوط به فروش بی - تی می باشد.

در جدول شماره 2 میکروارگانیزم هائی ذکر شده است که فهرست آن ها در ضمیمه شماره یک Annex 1 اروپائی (EU Direktive 91/414) اعلام شده است یا در حال تشریفات صدور اجازه فروش هستند. در جدول شماره 3 میکروارگانیزم هائی ذکر شده که طبق مقررات لیست 4 بایستی مجددا تقاضای اجازه فروش کنند یعنی میکروارگانیزم هائیکه قبل از تاریخ 26 جولای 1993 اجازه فروش در کشورهای عضو اتحادیه اروپا را داشتند.

میکروارگانیزم ها می توانند از چند جهت در دفع آفات مؤثر باشد و استفاده از آن ها در موارد زیر است :

- آنتاگونیست در دفع آفات بیولوژیکی
- فرآورده ها که در حفظ نباتات توانائی قارچ کشی، علف کشی و حشره کشی دارند
- منابع ژن های مقاوم برای استفاده در اصلاح نباتات

در درجه اول دفع آفات بیولوژیکی از توانائی آنتاگونیست ها (جدول شماره 4) استفاده می کند. میکروارگانیزم ها نیز مانند فرآورده آنتاگونیست ها می توانند در حفظ نباتات مورد استفاده قرار گیرند. برای مثال می توان به اسپینوسین های آ و بی Spinosyns A & B که از ترکیبات حشره کش اسپینوزاد Spinosad هستند (Dow Agro Inc., USA) و فرآورده آکتینومایسین در ساکاروپلی اسپورا *Saccharopolyspora spinosa* اشاره کرد. این مواد را آزمایشه تخمیر شده باکتری جدا کرده و خالص می کنند (Thompson et al., 2000).

در تهیه قارچ کش ها، از گروه استروبیلیورین Strobilurine از فرآورده آفت سوزنی برگ *Strobilurus tenacellus* استفاده می شود (Konradt et al., 1996).

سومین کاربرد میکروارگانیزم ها، شناسائی ژن های آن ها و استفاده از آن در انتقال به اصلاح نباتات است، ژن هایی که قادر به سنتز هرابه بی-تی هستند به گیاهان زراعی منتقل می شوند تا گیاهان در مقابل حشرات جونده مقاوم گردند (Peferoen, 1997). ژن های سمی باکتری فوتورابدوس *Photorhabdus luminesens*، که همزیست (symbiosis) نمائدی از جنس *Heterorhabditis* و

عامل بیماری زائی درحشرات است، توسط شرکت (nematop, e-nema GmbH) تولید و عرضه می شود تا برای مقاوم کردن گیاهان علیه حشرات به کار روند (Liu et al., 2003). ویروس ها، باکتری ها و قارچ ها نیز به عنوان آنتاگونیست مورد استفاده قرار می گیرند. سایر آنتاگونیست ها مانند تک سلولی های (microspore) بیماری زای حشرات که درحشره تولید عفونت می کنند به سختی در آزمایشگاه (*in vitro*) تکثیر می شوند، لذا تهیه آن ها درتولید انبوه که با قیمت های بازار رقابت کند، مشکل ساز است. تعداد گونه های تک سلولی ها زیاد ونحوه تأثیر آن ها کاملاً روشن نیست.

قارچ های جنس *Trichoderma* از تولیدات شرکت هلندی بنام تریانوم (Trianum, Koppert) و قارچ *Gliocladium* از تولیدات شرکت (BV, NL) و قارچ *Prestop, Verdera Oy, FIN* بنام پرستاپ، می توانند با حل دیواره سلول میسلیم با کمک آنزیم (lytic Enzyme) وارد میسلیم قارچ های عامل بیماری زا شده و آن ها را پارازیت نمایند و از بین ببرند این قارچ ها هیپرپارازیت (**Hyperparasites**) نامیده می شوند.

محققین، آنتاگونیست هائی را در میان قارچ های پیرامون ریشه (Rhizosphere) پیدا کرده اند که بر روی ریشه های میزبان خود رشد می کنند و با گسترش ریشه، آن ها هم تکثیر شده و از ریشه حفاظت می کنند. میکروارگانیزم های پیرامون ریشه مانند سایر میکروارگانیزم ها، سبب رشد گیاه می شوند و در عین حال مکانیزم مقاومت و عملکرد دفاعی گیاه را افزایش می دهند (Harman, 2006).

قارچ کونیوتیریوم *Coniothyrium minitans* از تولیدات شرکت (Contans, Prophyta) و قارچ *Ampelomyces quisqualis* (Whipps & Gerlagh, 1992)، به نام کنتانس، و قارچ *AQ10, Intrachem SpA, I*، (Falk et al., 1995) بنام ای-کیو 10 توانائی پارازیت کردن میزبان خود را دارند. قارچ کونیوتیریوم *Coniothyrium minitans*، سختینه یا اسکرت (sclerotium) را که شکل زمستان گذران قارچ است پارازیت و از آن تغذیه می کند.

آنتی بیوزها (**Antibioses**) به خاطر ترشح سم و آنتی بیوتیک از سایر مکانیزم های مؤثر دفع آفات هستند. گونه هائی از باکتری *B. subtilis* از شرکت (Serenade, Agraquest Inc., USA)؛ ماده ای تولید می کنند که خاصیت قارچ کشی دارد (مانند FZB 24, ABiTEP GmbH). در اثر تماس با قارچ های بیماری زا، توانائی باکتری افزایش می یابد و انتشار قارچ بیماری زا را محدود می سازد (Loeffler et al., 1986).

هپتانپولین های معطر (AHPs) (aromatic Heptaenpolyene) جزء آنتی بیوتیک های قارچ کش هستند که از قارچ *Streptomyces griseoviridis* تهیه و به وسیله شرکت (Mycostop, Verdera) عرضه می شود (Raatikainen et al., 1994).

جدول شماره 2 : مواد دفع آفات براساس میکروارگانیزم، اجازه فروش طبق EU Direktive 91/414 . (+ مواد با مجوز)، (- مواد با مجوز در حال بررسی)

نام تجارتي	نام شرکت	میکروارگانیزم	مورد مصرف	علامت ثبت
Preferal	Biobest, B	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	آنتاگونیست علیه مگس سفید	+
Contans	Prophyta, D	<i>Coniothyrium minitans</i>	پارازیت سختینه <i>Sclerotinia spp.</i>	+
Cedomon	Bioagri, S	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	برای ضد عفونی بیمارگرهای بذرزا	+
Prestop	Verdera, FIN	<i>Gliocladium catenulatum</i>	پارازیت چند منظوره قارچ ها	+
AQ 10			<i>Oidium tuckeri</i>	-
Serende	Intrachem, I	<i>Ampelomyces quisqualis</i>	قارچ کش چند منظوره	-
Bioact	Agraquest, USA	<i>Bacillus subtilis</i>	آنتاگونیست نماتد	-
Sporodex	Prophyta, D	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	علیه سفیدک	-
Spod-X	Plant Products, CAN	<i>Pseudozyma flocculosa</i>	<i>Spodoptera exigua</i>	-
	Certis, B	<i>Spodoptera exigua</i> NPV	ویروس	
BOC-1	Bio-Oz, ISL	Zucchini Yellow Mosaic Virus	علیه ویروس کم آزارکد و	

جدول شماره 3 : میکروارگانیزم هائیکه قبل از 27 جولای 1993 در کشورهای عضو اتحادیه اروپا اجازه فروش داشتند و در حال حاضر اجازه فروش آنها طبق مقررات 91/414 (لیست شماره 4) در جریان بررسی است

میکروارگانیزم	مورد استفاده
<i>Cydia pomonella</i> Granulosis Virus	علیه کرم سیب (<i>Cydia pomonella</i>)
<i>Bacillus thuringiensis</i> - <i>aizawai</i>	علیه پروانه ها علیه نماتد ها
<i>Bacillus thuringiensis</i> - <i>israelensis</i>	علیه پروانه ها علیه سوسک (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)
<i>Bacillus thuringiensis</i> - <i>kurstaki</i>	سیب زمینی
<i>Bacillus thuringiensis</i> - <i>tenebrionis</i>	آنتاگونیست باکتریایی <i>Fusariosen & Pythium</i> علیه
<i>Streptomyces griseoviridis</i>	علیه حشرات خاکزی
<i>Beauveria bassiana</i>	علیه لاروهای سوسک. <i>Melolontha spp.</i>
<i>Beauveria brongniartii</i>	علیه حشرات خاکزی
<i>Metarhizium anisopliae</i>	رقیب پوسیدگی (<i>Heterobasidion annosum</i>) قرمز در جنگل
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	Hyperparasit <i>Pythium ultimum</i>
<i>Pythium oligandrum</i>	Hyperparasit برای قارچ ها با صفت ازدیاد رشد
<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma polysporum</i> <i>Trichoderma viride</i>	تحریک برای ایجاد <i>Ophiostoma novo-ulmi</i> مقاومت در مقابل بیماری مرگ درختان شاه بلوط
<i>Verticillium dahliae</i>	آنتا گونیست علیه قارچ ها و مگس سفید، تریپس و شته
<i>Verticillium lecanii</i>	

زهرابه قارچ ها (mycotoxin) هم در ازبین بردن حشرات سهیم هستند. قارچ زهراستخراج شده از *M. antisopliae* از تولیدات شرکت (Teanure, Earth Bioscience Inc., USA) بنام تی نیور با ترشح آنزیم پروتئاز (protease) و آنزیم کیتیناز (chitinase) و دستروکسین (Destruxine) به اسکلت بیرونی حشره میزبان (Haemocoel) نفوذ می کند و در نهایت سبب ازبین رفتن پوسته سخت بیرونی حشره می شود (Vey et al., 2001). تولید زهرابه هم اساس حشره کشی بی - تی (Bt) از تولیدات شرکت (Xentari, Valent Bioscience Inc., USA) بنام گسن تاری هستند.

مهم ترین مکانیزم مؤثر علیه بیماری های گیاهی ایجاد مقاومت اکتسابی (induced resistance) توسط آنتاگونیست ها است. برخلاف عوامل بیماری زا در صورت تولید عفونت در گیاه ممکن است علاوه بر ایجاد علائم بیماری، مکانیزم مقاومت گیاه را هم افزایش دهند، میکروارگانیزم ها با توانایی آنتاگونیستی در گیاهان مقاومت ایجاد می کنند بدون اینکه علائم بیماری در گیاه بوجود آید. آنتاگونیست هایی که در دفع آفات بیولوژیکی مورد استفاده قرار می گیرند، از پیرامون ریشه (Rhizosphäre) جدا شده اند که PGPR یا ریزوباکتری های افزایش دهنده رشد گیاه (plant growth promoting rhizobacteria) نامیده می شوند و یا آنها را PGPF یا قارچ های افزایش دهنده رشد گیاه (plant growth promoting fungi) می نامند و از مواد گیاهی جدا (Entophytes) می شوند. ارتباط آن ها با گیاهان بر اساس همزیستی (symbiotic) می باشد.

میکروارگانیزم ها جذب ترشحات ریشه می شوند و ریشه ها نیز از مواد غذایی میکروارگانیزم های پیرامون ریشه استفاده می کنند. با زندگی همزیستی به ایمنی گیاهان نیز افزوده می شود و سبب توسعه ریشه ها می گردد. تعداد زیادی از مواد محرک الیسیاتور ها (Elicitors) نیز می توانند ایجاد مقاومت کنند. باکتری های گرم منفی مانند آهن برها یا Siderophore ها از گروه باکتری های *Pseudomonas spp.* نیز به صورت ی که ثابت شده است، ایجاد مقاومت می کنند. همینطور، لیپوپلی ساکارید ها نیز LPS (Lip polysaccharide) که از ترکیبات دیواره سلولی باکتری های گرم منفی هستند، محرک یا الیسیاتور (Elicitors) برای ایجاد مقاومت شناخته شده اند (van Loon et al., 1998)، ترکیب هموسرین لاکتون AHL = N-Acyl-LHomoserin نیز می تواند علائمی جهت افزایش (Quorum Sensing) به سنتز باکتری های گرم منفی ارسال کند و تولیدات ناشی از آن، برای افزایش جمعیت باکتری، در اختیار آن ها قرار می گیرد (Schuhegger et al., 2006). مقاومتی که از طرف میکروارگانیزم های آنتاگونیستی به طور سیستمیک در گیاه بوجود می آید، اختلاف زیادی با مقاومتی که بوسیله عوامل بیماری زا در گیاهان بوجود می آید، ندارد. با روش های ژنتیک مولکولی در گیاه مدل *Arabidopsis thaliana*، چگونگی ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاه، مکانیزم دفاعی

گیاه و چگونگی ادغام آنتاگونیست ها با گیاه میزبان، در دست بررسی است (Pieterse *et al.*, 2002 ; Iavicoli *et al.*, 2003).

جدول شماره 4 : حفاظت در مقابل بیمارگرهای گیاهی : نحوه تأثیر باکتری ها و قارچ های آنتاگونیست

نوع تأثیر	نحوه عمل	مثال
Hyperparasites	حمله و تکثیر در میزبان	<i>M. anisopliae</i> , <i>Trichoderma</i> spp.
Antibioses	کشتن میزبان از طریق آنتی بیوتیک، زهرابه و آنزیم	<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Streptomyces griseoviridis</i>
Resistance induction	القا مقاومت برای بالا بردن قدرت دفاعی	<i>Bacillus subtilis</i> , v.a.
growth promoter	تولید هورمون های گیاهی	<i>Serratia plymuthica</i> , v.a.
Area Competitor & food suppliers	جایگزین شدن در نفا طی که مورد حمله بیمارگر است	<i>Phlebiopsis gigantea</i>

کمک به رشد گیاه (**Growth promotion**) در بیشتر میکروارگانیزم های آنتاگونیستی دیده می شود. بیشتر گیاهان، در مراحل اولیه رشد به آلودگی توسط عوامل بیماری زا حساس هستند. در نتیجه با کمک آنتاگونیست ها، مراحل آلودگی راتحمل کرده (disease escape effect) و به رشد خود ادامه می دهند. حمایت از رشد گیاه در غلات برای مبارزه با عوامل بیماری زای خاکزاد، با ضد عفونی بذرتوسط *Pseudomonas chlororaphis* از تولیدات شرکت (Cedomon, Bioagri, S) بنام سدومون به اثبات رسیده است. باکتری *Serratia plymuthica* از تولیدات شرکت (Rhizostar, e-enema GmbH) بنام ریزواستار در کشت منداب و توت فرنگی با تولید هورمون (Indol-3-acetic acid) از رشد گیاه حمایت می کند (Kurze *et al.*, 2001). تولید هورمون های گیاهی (مانند Auxine، Zytokine، Gibberelline) توسط باکتری های پیرامون ریشه و اندوفیت ها به اثبات رسیده است (Frankenberger & Arshad, 1995 ; Bottini *et al.*, 2004). از طریق پائین نگاهداشتن رشد عوامل بیماری زا، کود دادن به گیاهان و مواد معدنی و پوشش محل عفونت ریشه گیاهان توسط

آنتاگونیست که سبب تشدید تولید قارچ زهرها و آنتی بیوتیک شده و توانائی رقابت آنتاگونیست ها را افزایش می دهد، می توان به رشد گیاه به صورت غیرمستقیم توسط ریزوباکتری های افزایش دهنده رشد، کمک کرد. از طرف دیگر PGPR توانائی آن را دارند که تسهیلات جذب مواد غذائی را برای گیاه فراهم نمایند.

روش های فنآوری ژنتیک در بهینه سازی میکروارگانیسم ها

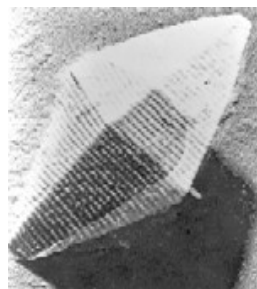
روش های فنآوری ژنتیک برای بهینه سازی دفع آفات بیولوژیکی تا کنون کمتر مورد استفاده قرار گرفته است. برقراری شرایط سخت برای صدور مجوز به کاربرد میکروارگانیسم ها و کسب این مجوز با هزینه بالا صورت می گیرد، لذا شرکت ها علاقه ای ندارند که با فنآوری ژنتیک، میکروارگانیسم های جدیدی بوجود آورند و مقررات صدور مجوز در استفاده از آنها را بازم بیشتر مشکل تر کنند. از طرف دیگر با انجام این کار مشتریهای مهم خود در کشاورزی بیولوژیکی - آلی را از دست می دهند. امکان و اصول بهینه سازی دفع آفات بیولوژیکی البته وجود دارد مانند بی - تی (Bt) که در اینجا به آن به صورت کوتاه می پردازیم اما استفاده از ژن های بی - تی (Bt) در گیاهان تراژن از این موضوع خارج است.

جدایه های بی - تی (Bt) از چهار تحت گونه *tenebrionis*، *aizawai*، *kurstaki* و *israelensis* در تولیدات کنونی وجود دارد. نحوه عمل بی - تی (Bt) بر اساس کریستالهای پروتئین است (شکل 1) که در طول تولید اسپرها بوجود می آید.

ژن های مربوطه در پلاسמיד ها قرار دارند و به نام ژن های کریستال (Cry 1 to Cry 50) نامیده می شوند. خانواده آئیکه توانائی ساختن ژن های کریستال (Cry) هستند باهم تفاوت زیادی دارند

شکل شماره 1 : نمائی از کریستال های پروتئین بی - تی (Bt) در فعالیت علیه پروانه ها، توسط

میکروسکپ الکترونی (Foto: *Bacillus thuringiensis* Toxin Specificity Database,) (Canada)



(http://www.lifesci.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/) و تاکنون بررسی توالی بیش از 200 ژن انجام شده است. در بین این گروه اصلی، تفاوت های دیگری هم در بازهای توالی دیده می شود. از این توانائی ها تاکنون استفاده نشده است.

تولیدات بی -تی در مقایسه با حشره کش های شیمیائی، کند تر عمل می کنند. طیف تأثیر آن ها محدود است و در مزرعه در مقابل اشعه مستقیم نور آفتاب غیر فعال می شوند. برای اولین بار مشاهده شده است که *Plutella xylostella* در مقابل بی - تی، مقاوم شده است (van Rie & Ferre, 2000). برای رفع این معایب از بی - تی (Bt) سعی شده است تولید آن را بهبود بخشند. ابتدا سعی شد با ادغام بی - تی (Bt) ها آن را جفت کنند (conjugation) و سعی کردند ترکیب پلاسمید ها را طوری تهیه کنند که طیف تأثیری گذاری بیشتری داشته باشد. جفت شدن در باکتری ها روندی طبیعی است. در این مرحله سلول دهنده (Donor) به سلول گیرنده (Rezipient) وارد می شود. با کمک این فناوری نوعی (Bt) به نام فواویل از تولیدات شرکت (Foil, Ecogen Inc.) به دست آمد که علیه پروانه ها و سوسک سیب زمینی تواما مؤثر است. تولید مشابه دیگری بنام ام-وی - پی از تولیدات شرکت (MVP, Mycotec Inc) در آمریکا به بازار آمده است. برای جلوگیری از کاهش سمیت کریستال های پروتئین (Bt) در مقابل نور آفتاب، توالی ژنی را برای تولید سم در باکتری *Pseudomonas fluorescens* منتقل کرده اند. باکتری های *Pseudomonas* مواد رنگی را در غشاء سلولی ذخیره می کنند تا در مقابل نور ماورابنفش (UV) محافظت شود. سم به وسیله باکتری *Pseudomonas* ساخته می شود و در پایان باکتری ها را از بین برده ولی سم در سلول های رنگی باقی می ماند (Sanchis, 2000). یک اقدام جالبی را در این مورد شرکت (Crop Genetics International) انجام داده است. این شرکت ژن های (Cry Gen) کریستال پروتئین رابه باکتری اندوفیت *Clavibacter xyli* منتقل کرده اند که این باکتری در سیستم آوندی ذرت زندگی می کند. بذرهاى ذرت را با این باکتری با اسم تجارتي (InCide) ضد عفونی می کنند. بدین وسیله موفق شده اند با سوسک ذرت که ساقه را سوراخ کرده و در آنجا زندگی می کند و به سختی قابل کنترل می باشد، مبارزه کنند (Lampel et al., 1994). به دلیل این که نمی توان بی - تی (Bt) را در ضد عفونی خاک به کاربرد، سعی شده است که ژن (Cry Gen) به در ریزوبیوم ها منتقل نمایند تا از حمله آفت *Sitona sp.* (Leguminose) که در خاک وجود دارد، در امان بماند (Skot et al. 1990). احتمالاً دیواره روده حشرات، که با چگونگی مقاومت آنها رابطه ای مستقیم دارد می توان با تغییراتی در گیرنده های (Receptors) روده، مقاومت آن ها را شکست. اگر این تئوری به حقیقت به پیوندد که توالی توکسین را باید به نحوی تغییر داد که به گیرنده های جهش داده اتصال پیدا کند، در آن صورت می توان از مقاومت حشره جلوگیری کرد. زیرا

هیچ گونه تلقیح مقاومت درتوکسین های (Bt) بین گیرنده ها (Receptors) وجود ندارد، می توان مشکل کنونی را با تغییر نوع توکسین که به گیرنده دیگری متصل خواهد شد، حل کرد. این تئوری را که برای بی - تی گفته شد می توان درمورد آنتاگونیست ها هم اجرا کرد اما در مراحل های که چگونگی مکانیزم اثرگذاری آن ها کاملا روشن شده باشد. از این نظر بی - تی تنها موردی است که تأثیر آن با فنآوری ژنتیک بهینه سازی شده است. بهینه سازی ژنتیکی سایر میکروارگانیسم های دفع آفات بیولوژیکی در آینده نزدیک بعید بنظر میرسد.

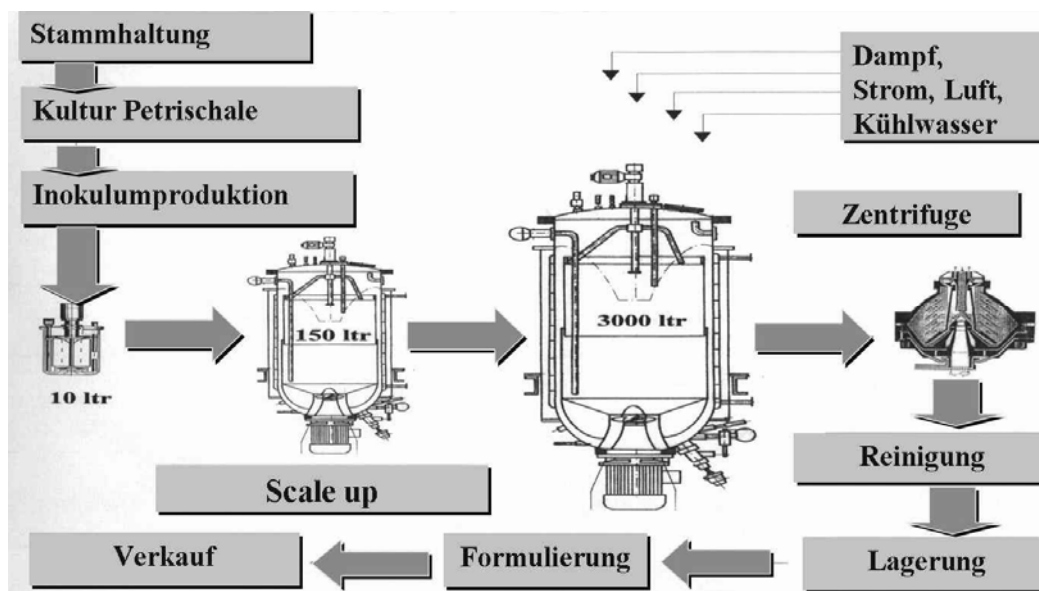
فنآوری زیستی در تولید میکروارگانیسم ها و نماتد ها

شرط پیشرفت دفع آفات بیولوژیکی تولید انبوه و ارزان قیمت آنتاگونیست ها و امکان ذخیره کردن آن ها بدون کاهش کیفیت آن ها است. بعضی از انواع قارچ ها مانند *Metarhizium anisopliae* اسپرهای عفونی خود را فقط در محیط کشت های جامد تولید می کنند و باید هم در محیط کشت های جامد تکثیر شوند لذا تکثیر این قارچ ها زمان بیشتری لازم دارد و کار کردن با آن ها مشکل است. شرکت (Prophyta) به آدرس رایانه ای (www.prophyta.de) فنآوری منحصربه فردی را در زمینه کشت انبوه قارچ های نواری در محیط کشت های جامد پیدا کرده است. در کارخانه می توان روزانه بیش از 500 کیلوگرم مواد قارچی تولید کرد.

تهیه میکروارگانیسم ها و نماتد های بیماری زا در حشرات در محیط کشت مایع که راکتورهای زیستی Bioreactor نامیده می شوند، مانند آنچه در تهیه مواد غذایی معمول است، انجام می شود. برای کشت نماتد ها باید این فنآوری بیشتر توسعه پیدا کند (Ehlers, 2001).

تولید با جدایه های خالص شروع می شود. ابتدا ارگانیسم ها در ارلن مایر یا فلاسک های شیشه ای کشت داده و بعد به راکتورهای زیستی اضافه می شوند (شکل 2). فرایند های بعدی قدم به قدم در سیستم بسته (Scaling-up) پیش می رود بدین صورت که مایه کشت قارچ ها از ظرف های کوچک تر پس از استریل یا ضد عفونی با بخار، به راکتور زیستی بزرگ تر بدون این که دوباره آلوده شوند، منتقل می شوند.

شکل 2 : نمایی از روند تهیه فناوری زیستی میکروارگانیسم ها و نماتد ها



فاکتورهای مهم در این روند عبارت است از غلظت اکسیژن، حرارت، فشار، اسیدیته یا pH، دورچرخش به مخلوط کن که به وسیله میله های حساس داخل دستگاه اندازه گیری و به کامپیوتر داده می شود. کامپیوتر این اعداد رسیده را با داده های اصلی مقایسه، و در صورت اختلاف آن ها را تنظیم می کند. تمام فعالیت های این فرایند با سیم کشی های بیرونی به هم ارتباط دارد و در صورت لزوم می توان با اینترنت آن ها را متوقف یا تنظیم کرد. زمان لازم برای این فرایند در مورد باکتری ها 1-3 روز، در مورد قارچ ها 2-5 روز و در مورد نماتد ها 10-16 روز طول می کشد. به دلیل هزینه زیاد سرمایه گذاری در ماشین آلات راکتورهای زیستی (فناوری تنظیم، هدایت، پمپ ژنراتورهای تولید بخار، ماشین آلات سرد کننده و ماشین آلات جمع آوری تولیدات و نگهداری آن ها) و در کنار آن هزینه تهیه مایه ها و اضافه شدن هزینه هر روز کار اضافی، سرمایه گذاری بیشتری را لازم دارد. هر قدر کارخانه بزرگ تر باشد با شرط این که ضد عفونی و تمیز کردن ماشین آلات به صورت خود کار صورت گیرد، هزینه تولید کمتر خواهد شد. راه اندازی ماشین آلات تا تولید 1000 لیتر در روز تغییری در پرسنل ایجاد نمی کند. پس از پایان رشد میکروارگانیسم ها، دوره پایانی (downstream processing) شروع می شود. تولید مواد دفع آفات بیولوژیکی کار کمتری دارد، مواد تولید شده را در سانترفوزهای معمولی تغلیظ و سپس برای نگهداری آن یا تمام تولید را خشک می کنند یا این که در شرایط محیط سرد نگاه می دارند. برای بعضی از تولیدات ارگانیسم ها مرحله تخمیر هم صرفه جویی

می شود زیرا مایه تهیه شده مستقیماً مورد استفاده قرار می گیرد. اما اگر یک فرآورده مانند اسپینوزاد (Spinosad) تولید شود، باید مایه به دست آمده با هزینه زیادتری خالص گردد. مشکل مواد دفع آفات بیولوژیکی، نگهداری آن ها است. اگر موفقیتی با خشک کردن وجود داشته باشد، یعنی اگر ارگانیزم کم آبی را تحمل کند، در آن صورت موقع استفاده می توان ارگانیزم را به صورت مایع پاشیدنی درآورد یا آن را در شرایط خلاء خشک و نگهداری کرد. این روش ها برای نماتد ها مناسب نیست، تولیدات نماتد ها به صورت تازه فروخته می شوند. فقط ترابری مدرن و سریع می تواند تضمین کند که این تولید تازه بدون ازدست دادن کیفیت خود، به دست مصرف کننده به رسد. باکتری های گرم منفی هم زیاد قابل نگهداری در شرایط خشک نیستند و مدت نگهداری آن ها محدود می باشد. باسیل های گرم مثبت و اغلب قارچ ها را می توان مدت زیادتری نگهداری کرد و بسته بندی و تجارت آن ها ساده تر است. مخلوط مواد همراه سبب طولانی شدن تاریخ مصرف تولیدات و افزایش اثر آن ها می گردد (Burgess, 1998).

جنبه های اقتصادی-اجتماعی حفظ نباتات بیولوژیکی

نقش و توانائی میکروارگانیزم ها در درون گیاه (entophytes) و بیرون از گیاه (rhizosphere) در مراحل ابتدایی و پایه ای است. اگر در نظر داشته باشیم که فقط 5% از ارگانیزم های پیرامون ریشه (rhizosphere) را می توان کشت داد و به زیست شناسی آن ها پی برد به سختی می توان تصور کرد چه اندازه توانائی در ارگانیزم هائی نهفته است که اطلاعاتی از آن ها به علت عدم کشت و عدم شناسائی زیست شناسی در تولید گیاهان ناشناس مانده اند. ارگانیزم های شناخته شده هم تاکنون کمتر به کار برده شده اند. البته دلایل زیادی در این مورد وجود دارد که یکی از آن ها وضعیت بازار و تجارت مواد دفع آفات بیولوژیکی است. تمام شرکت هائی که با این موضوع سروکار دارند تاجر (KMUs) هستند و سرمایه آن ها برای تحقیق و توسعه (F & E) و بازاریابی کافی نیست. بیشتر شرکت ها فقط یک تولید را می فروشند و در نتیجه بازاریابی را از نظر قیمت و رقابت مشکل می سازند. بعضی از شرکت ها دارای مجموعه ای از میکروارگانیزم ها و تشکلات تحقیقاتی هستند اما نمی توانند آن ها را عرضه کنند. به علت کمبود مشتری، فروش آن هم کم می باشد. مواد دفع آفات بیولوژیکی از نظر اکولوژی مفید هستند اما از نظر اقتصادی به صرفه نیست زیرا بازار فروش بسیار کوچکی در اختیار دارند.

بزرگ ترین مانع در این گذر، کسب مجوز برای این تولیدات است. مقررات اتحادیه اروپا شرایط صدور مجوز تولید و فروش را تحت پروتکل شماره 91/414 تعیین کرده است. در اصل، این مقررات برای مواد ساخته شده ی صنعتی مقرر شده است اما شامل مواد دفع آفات میکروبی هم می شود

، با وجود این که خطرات مشابهی در استفاده از میکروارگانیسم ها برای دفع آفات تشخیص داده نشده است. زیاده روی در اجرای این مقررات، در عمل از پیشرفت های علمی کاسته است. به نحوی که امروزه هیچ شرکتی در کشورهای اتحادیه اروپائی حاضر نیست میکروارگانیسم جدیدی را برای حفظ نباتات به ثبت برساند. مواردی که مربوط به حفظ نباتات بیولوژیکی می شود، عدم تطبیق حقوق حفظ نباتات در مقررات مذکور است. طبق این اصل مقررات خود را با میکروارگانیسم تحت شماره (EU Dir. 2001/36 & 2005/25) وفق داده است. با وجود کوشش های مسئولین اتحادیه کشورهای اروپا (SANCO)، در تنظیم مقررات صفات میکروارگانیسم و ادغام آن ها در قوانین، زمان لازم برای ثبت تولیدات میکروارگانیسم ها در اروپا، سه برابر زمان لازم در آمریکا می باشد. شرکت های تولید کننده، به علت انتظار برای کسب مجوز در سطح اروپا و انتظار مجدد در کشور خود بسیار متضرر می شوند. با این روش پیشرفت های علمی نمی تواند به مرحله عمل دربیاید. بیشتر آنتاگونیست ها در مجموعه های محققین از بین می روند و به ندرت یک ارگانیسم از آزمایشگاه به بازار راه می یابد. فقط شرکت های در اروپا توانسته اند تولیدات خود را به ثبت برسانند که پشیمانان ثروتمندی داشتند یا این که کمک های مالی بیشتری دریافت کرده اند. لذا سایر شرکت ها از ابتدا جرأت نمی کنند نسبت به ثبت تولیدات خود اقدام کنند و فعالیت های اقتصادی خود را به رشته های دیگر انتقال داده اند. یکی از اقدامات کشورهای اتحادیه اروپائی تحت عنوان (REBECA – Regulation of Biological Control Agents ; www.rebeca-net.de) کوشش در تجدید نظر در مقررات است تا تولیدات بیولوژیکی مانند حشرات مفید، فرمون ها و عصاره گیاهان راهم در مقررات در حال تدوین بگنجانند و بهتر کند. مراجعه شود به www.rebeca-net.de تارنمای

چشم انداز آینده

اگر فرض شود همه روش های حفظ نباتات بیولوژیکی کاربرد عملی داشته باشد، می توان حفظ نباتات بیولوژیکی را به صورت کلی در ردیف فنآوری زیستی قرارداد. تولید مقدار انبوهی از حشرات مفید و تولید آزمایشگاهی (*in vitro*) میکروارگانیسم ها فقط با استفاده از روش های بیوتکنولوژی ممکن است. در این بخش در سال های اخیر پیشرفت های زیادی انجام گرفته و حفظ نباتات بیولوژیکی در باغ داری و کشاورزی نقش روزافزونی پیدا کرده است. ایجاد روزافزون مقاومت حشرات در مقابل حشره کش های شیمیائی در سبزی کاری ها و اضافه شدن مشکلات باقیمانده سموم دفع آفات در مواد غذایی، می تواند در ادغام دفع آفات بیولوژیکی در راه بردهای مبارزه با آفات تأثیرگذار باشد. چارچوب شرایطی که در به ثبت رسانیدن مقرر شده است، مانع از بهینه کردن استفاده از این فنآوری است. جامعه

ما یک جامعه ریسک دار شده است. مردم دنباله رو مدیریت هائی هستند که کارشان فقط اعلام ریسک و خطرات و به تجربه های علمی کمتر اعتماد می کنند. بررسی های تحقیقاتی نشان می دهد که خطر استفاده از کاربرد های بیولوژیکی حفظ نباتات به مراتب بسیار کمتر است و مزایای بسیار بالائی برای محیط زیست دارد. غیر از شکل گیری مثبت و اخذ مجوز، آینده نشان خواهد داد درصد رشد راه برد های حفظ نباتات بیولوژیکی امکان پذیر است

Literatur

- Bottini, R., Cassan, F., Piccoli, P., 2004: Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Escherichia Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 497-503.
- Brust, G. *ESCHERICHIA*, 1991: Augmentation of an endemic entomogenous nematode by agroecosystem manipulation for the control of a soil pest. *Agriculture Ecosystems and Environment* 36, 175-184.
- Burges, H.D., 1998: Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Cullen, J.M., 1985: Bringing the cost benefit analysis of biological control of *Chondrilla juncea* up to date. *Escherichia* In: Proceedings VI International Symposium on Biological Control of Weeds. *ESCHERICHIA*. Delfosse (ed.) Agriculture Canada, pp. 145-152.
- Ehlers, R.-U., 2001: Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied Microbiology & Biotechnology* 56, 623-633.
- Falk, S.P., Gadoury, D.M., Cortesi, P., Pearson, R.C., Seem, R.C., 1995: Parasitism of *Ucinula necator* cleistothecia by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. *Phytopathology* 85, 794-800.
- Frankenberger, W.T., Arshad, M., 1995: *Phytohormones in soils*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Frost and Sullivan, 2001: Introduction to the European Biopesticides Market. <http://www.frost.com/prod/servlet/report-homepagEscherichiapag?repid=3905-01-00-00-00>
- Grenier, S., De Clerq, P., 2003: Comparison of artificially vs. naturally reared natural enemies and their potential for use in biological control. In: J.C. van Lenteren (ed.) *Quality control and production of biological control agents - Theory and testing procedures*. CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 115-132.
- Harman, G. *ESCHERICHIA*, 2006: Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp.* *Phytopathology* 96, 190-194.
- Iavicoli, A., Boutet, *ESCHERICHIA*, Buchala, A., Metraux, J.P., 2003: Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Plant Microbe Interactions* 16, 851-858.
- Julien, M.H., Griffiths, M.W., 1999: *Biological Control of Weeds. A World Catalogue of Agents and their Target Weeds*. CABI Publishing, Oxon, UK.
- Konradt, M., Kappes, *ESCHERICHIA*, Hiemer, M., Petersen, H.H., 1996: Amistar Reg. - a strobilurin for the control of cereal diseases. *Gesunde Pflanzen* 48, 126-134.
- Kurze, S., Bahl, H., Dahl, R., Berg, G., 2001: Biological control of fungal strawberry diseases by *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Plant Disease* 85, 529-534.

- Lampel, J.S., Canter, G.L., Dimock, M.B., Kelly, J.L., Anderson, J.J., Uratani, B.B., Foulke, J.S. Jr, Turner, J.T., 1994: Integrative cloning, expression, and stability of the cryIA(c) gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 501-508.
- Liu, D., Burton, S., Glancy, T., Li, Z.S., Hampton, R., Meade, T., Merlo, D.J., 2003: Insect resistance conferred by 283-kDa *Photorhabdus luminescens* protein TcdA in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology* **21**, 1222-1228.
- Loeffler, W., Tschen, J.S.M., Vanittanakom, N., Kugler, M., Knorpp, ESCHERICHIA, Hsieh, T.F., Wu, T.G., 1986: Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3. A comparison with activities of other *Bacillus antibiotics*. *Journal of Phytopathology* **115**, 204-213.
- Nielsen,-O, Philipsen,-H., 2005: Susceptibility of *Meligethes spp.* and *Dasyneura brassicae* to entomopathogenic nematodes during pupation in soil. *BioControl* **50**, 623-634.
- Nitzsche, O., Ulber, B., 1998: Einfluss differenzierter Bodenbearbeitungssysteme nach Winterraps auf die Mortalität einiger Parasitoiden des Rapsglanzkäfers (*Meligethes spp.*). *Zeitschr Pflkr Pflschutz.* **105**, 417-421.
- Peferoen, M., 1997: Insect control with transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. In: Carozzi, N., Koziel, M. (eds.) *Advances in insect control*. Taylor & Francis, London, pp. 21-48.
- Pieterse, C.M.J., Wees, S.C.M. van, Ton, J., Pelt, J.A. van, van Loon, L.C., 2002: Signalling in rhizobacteria-induced systematic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* **4**, 535-544.
- Raatikainen, O.J., Paivinen, T.H., Tahvonen, R.T., 1994: HPLC separation and subsequent detection of aromatic heptaene polyenes in peat after treatment with *Streptomyces griseoviridis*. *Pesticide Science* **41**, 149-154.
- Sanchis, V., 2000: Biotechnical improvement of *Bacillus thuringiensis* for agriculture control of insect pests: benefits and ecological implications. In: Charles, J.-F., Delécluse, A., Nielsen-Le Roux, C. (eds.): *Entomopathogenic Bacteria : from Laboratory to Field Application*. Kluwer, Dordrecht, pp. 441-460.
- Schuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S., Bahnweg, G., Knappe, C., Vogg, G., Hutzler, P., Schmid, M., Breusegem, F.van, Eberl, L., Hartmann, A., Langebartels, C., 2006: Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing *Rhizosphere bacteria*. *Plant Cell & Environ* **29**, 909-918.
- Skot, L., Harrison, S.P., Nath, A., Mytton, L.R., Clifford, B.C., 1990: Expression of insecticidal activity in *Rhizobium* containing the delta-endotoxin gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Plant and Soil* **127**: 285-295.
- Susurluk, A., 2005: Establishment and persistence of the entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. CAU Kiel.
- Thompson, G.D., Dutton, R.; Sparks, T.C., 2000: Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery program *Escherichia Pest Management Science* **56**, 696-702.
- van Lenteren, J.C., Tommasini, M.G., 2003: Mass production, storage, shipment and release of natural enemies. In: J.C. van Lenteren (ed.) *Quality control and production of biological control agents - Theory and testing procedures*. CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 181-190.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., 1998: Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **36**, 453-483.
- Van Rie, J., Ferré, J., 2000: Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein. In: Charles, J.-F., Delécluse, A., Nielsen-Le Roux, C. (eds.):

- Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application. Kluwer, Dordrecht, pp. 219-236.
- Vey, A., Hoagland, R., Butt, T.M., 2001: Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: T.M. Butt, C. Jackson, N. Magan (eds.) Fungi as biocontrol agents - progress, problems and potential. CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 311-346.
- Whipps, J.M., Gerlagh, M., 1992: Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. Mycological Research 96, 897-907.

گیاهان متحمل به علف کش ها – مصرف و آینده این گیاهان

برن وارد مرلندر و آندریاس فون تیدمان

Bernward Märländer¹ & Andreas von Tiedemann²¹Institut für Zuckerrübenforschung, Hotenser Landstr. 77, 37079 Göttingen (maerlaender@ifz-goettingen.de)²Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung Allgemeine Pflanzenpathologie & Pflanzenschutz, Georg-August-Universität, Grisebachstr. 6, 37077 Göttingen (atiedemann@gwdg.de)

کاربرد ارقام تراژن متحمل به علف کش ها

با کاربرد گیاهان تراژن، کشت گیاهان متحمل به علف کش ها نیز مورد توجه قرار گرفت. کشت این گیاهان بدون توجه به نوع آن از نظر اقتصادی اهمیت زیادی در دنیا دارد و سطح زیرکشت آن ها مرتباً روبه افزایش است (جدول شماره 1). سطح زیرکشت گیاهان تراژن متحمل به علف کش ها از سال 2005 به بیش از 63.7 میلیون هکتار رسیده و 71% کل گیاهان تراژن را به خود اختصاص داده است.

جدول شماره 1 : سطح زیرکشت مهم ترین گیاهان تراژن متحمل به علف کش ها در سال 2005 در دنیا

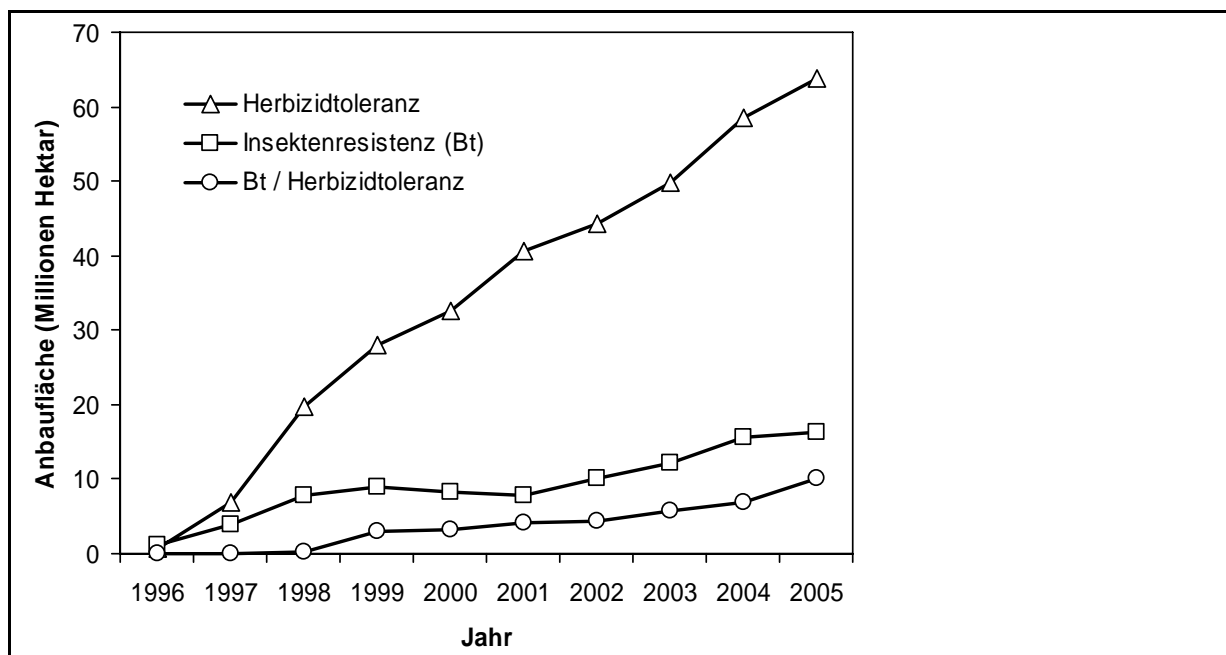
نوع زراعت	سطح زیرکشت به میلیون هکتار	درصد %
سویا	54.4	60
ذرت	3.4	4
منداب	4.6	5
پنبه	1.3	2
	(63.7)	(71)
بی تی + ذرت	6.5	7
بی تی + پنبه	3.6	4
	(10.1)	(11)

منبع مورد استفاده : جیمز 2005

به این آمار معادل 10.1 میلیون هکتار یا 11% کل کشت گیاهان تراژن، ترکیبی از گیاهان متحمل به علف کش ها و مقاوم به حشرات نیز (stacked genes or stacked traits) اضافه می شود. مقدار گیاهان تراژن بی - تی خالص معادل 16.2 میلیون هکتار یا 18% سطح زیرکشت کل گیاهان تراژن در دنیا است.

گیاهان متحمل به علف کش ها در مقابل علف کش گلیفوسات (Glyphosat System Roundup) و علف کش گلو فوسینات (Glufosinat System LibertyLink, LL) کاملاً متحمل هستند. گیاهان تراژن متحمل به علف کش های بروموگسینیل Bromoxynil، ایمیزولینون Imidazolinon و سولفونیل اورین Sulfonylurine از اهمیت کمتری برخوردار هستند. گیاهان متحمل به علف کش ایمیزولینون Imidazolinon و سولفونیل اورین Sulfonylurine را می توان با موتاسیون اکتسابی مواد شیمیائی هم به دست آورد و این عمل اهمیت اقتصادی بسیار زیادی دارد.

سویای متحمل به گلیفوسات Glyphosat در 54.4 میلیون هکتار کاشته می شود یعنی 60% سطح زیرکشت گیاهان تراژن دنیا (جدول 1) را به خود اختصاص داده است و در حال حاضر در نه کشور جهان کاشته می شود. از سال 2004 تا 2005 به سطح زیرکشت سویای متحمل به گلیفوسات، 6 میلیون هکتار یا 12% دیگر هم اضافه شده است.



شکل 1 : توسعه سطح زیرکشت گیاهان تغییر ژن از سال 1996 تا 2005 (James, 2005)

(در شکل یک منحنی با علامت مثلث : گیاهان متحمل به علف کش ؛ منحنی با علامت مربع : گیاهان مقاوم به حشره کش ؛ منحنی با علامت دایره : گیاهان متحمل به علف کش + بی تی)

ذرت، منداب و پنبه متحمل به علف کش ها در سطحی معادل 9.3 میلیون هکتار (11% سطح کل کشت گیاهان تراژن) در دنیا کاشته می شوند (جدول شماره 1). در بین ارقام ذرت و منداب، گیاهان متحمل به علف کش گلیفوسات Glyphosat و هم متحمل به علف کش گلو فوسینات Glufosinat وجود دارند. در صورتیکه ارقام پنبه بیشتر متحمل به علف کش گلیفوسات Glyphosat هستند.

در اروپا برای 58 نوع از 79 نوع مواد غذایی و یا خوراک دام درخواست صدور مجوز شده و یا این که با این درخواست ها موافقت شده است. این گیاهان تراژن یا متحمل به علف کش ها، مقاوم به حشرات و یا گیاهان تراژن با گل های نر عقیم هستند (جدول شماره 2).

برای کاشت در کشورهای اروپایی ذرت های مقاوم به گلو فوسینات Glufosinat با T25 ترنمان شده اند، اما در حال حاضر در بازار عرضه نمی شوند. همچنین کاشت و تولید بذرها ی هیبرید برای منداب مربوط به عملکرد (MS1 x RF1) و (MS1 x RF2) موافقت شده است. این هیبرید ها متحمل به علف کش گلو فوسینات Glufosinat و دارای گل های نر عقیم هستند ولی این گیاهان هم در حال حاضر کاشته نمی شوند.

در کشورهای اتحادیه اروپا، به طوری که در جدول شماره 2 دیده می شود، برای سایر گیاهان تراژن که به علف کش ها متحمل هستند درخواست مجوز شده که برای استفاده مواد غذایی یا خوراک دامی هستند. در حال حاضر 14 تقاضا که شامل یک رقم پنبه، 7 رقم ذرت، 3 رقم منداب، یک رقم سویا، یک رقم چغندر قند و یک رقم چغندر علوفه ای جهت خوراک دام است، تحت اقدام و تصمیم گیری می باشد. 6 رقم از 7 رقم ذرت دارای خواص مشترک متحمل به علف کش ها و مقاوم به حشرات هستند. در این مقاله بیشتر به کشت و اثر گیاهان تراژن مهم اروپایی مانند چغندر قند، ذرت و منداب پرداخته خواهد شد.

مکانیزم گیاهان تراژن متحمل به علف کش

انتقال اولین ژن با توانائی متحمل به علف کش ها HT (Herbicide Tolerance) به وسیله شرکت Calgene در سال 1994 به تقاضای Monsanto بر روی توتون و اطلسی انجام شد. گیاهان متحمل به علف کشی که امروزه در بازار به نام تجاری راونداپ Rounup Ready وجود دارد، یک ژن برای ساختن EPSP-synthesis (5-enol-pyruvyl-3-shikimatphosphat) در باکتری *Escherichia coli* شبیه سازی شده (cloned) و توسط آگروباکتریوم *Agrobacterium* به سلول

های گیاهی منتقل گردید. گیاهان به دست آمده از این سلول ها (regenerated plants) نشان دادند که دارای آنزیمی با غلظت بالائی هستند که می توانند علف کش گلیفوسات Glyphosat با غلظت بالا را تحمل کنند. گلیفوسات یک علف کش غیرانتخابی است با سمیت متناسب اکولوژی و با خواص سم

جدول شماره 2 : درخواست صدورمجوز برای کاشت گیاهان تراژن متحمل به علف کش ها و یا با سایرخواص دیگربرای مواد غذایی و خوراک دام طبق مقررات اتحادیه اروپا تحت شماره RL 2001/18/EG یا VO (EG) 1829/2003 ؛ جولای 2006

نوع گیاه	تراژن	شرکت سازنده	خواص
پنبه	MON 1445	Monsanto	متحمل به علف کش
ذرت	59122 x NK 603	Pioneer/Mycogen	متحمل به علف کش حشره کش
ذرت	59122 x 1507 x NK 603	Pioneer/Mycogen	متحمل به علف کش
ذرت	1507 x 59122	Dow/Pioneer	متحمل به علف کش حشره کش
ذرت	59122	Pioneer /Mycogen	متحمل به علف کش حشره کش
ذرت	1507 x NK 603	Pioneer/Mycogen	متحمل به علف کش حشره کش
ذرت	NK 603 x MON 810	Monsanto	متحمل به علف کش حشره کش
ذرت	NK 603	Monsanto	متحمل به علف کش
منداب	T 45	Bayer CropScience	متحمل به علف کش
منداب	Liberator phoe6/Ac	Bayer CropScience	متحمل به علف کش
منداب	GS40 / 90phoe6/Ac	Bayer CropScience	متحمل به علف کش
سویا	MON 40-3-2	Monsanto	متحمل به علف کش
چغندر قند	H7 -1	KWS / Monsanto	متحمل به علف کش
چغندر علوفه ای	A5-15	Danisco/ DLF Tri- folium / Mondanto	متحمل به علف کش

شناسی که فقط از ماده EPSP موجود در گیاهان جلوگیری می کند. این ماده مسئول ساختن اسید آمینه های معطر می باشد.

بعد از اولین ساختن موفقیت آمیز تحمل پذیری گیاهان به علف کش، انواع دیگری از Roundup Ready به بازار آمده است. مخصوصاً در ذرت ژن *cp4 epsps* از کلکسیون CP4 باکتری های آگروباکتریوم *Agrobacterium tumefaciens* استفاده شده است که اختلاف کمی با EPSPS کد شده گیاهی دارد و حساسیت کمتری به گلیفوسات Glyphosat نشان می دهد. برای بهتر کردن تحمل پذیری گیاه و ایمنی مصرف آن، می توان ژن *cp4 epsps* را با ژن هائی مخلوط کرد تا به از بین بردن علف کش گلیفوسات Glyphosat در گیاه سرعت بیشتری بخشد. برای این منظور، ژن *goxv247* (Glyphosat-Oxidase-Gens) از باکتری خاک *Ochrobactrum anthropi* به منداب (*Brassica napus* L.) و از *Achrombacter* sp. به چغندر (*Brassica rapa* L.)، منتقل شدند که در از بین بردن و تبدیل گلیفوسات Glyphosat به Acid Glyoxylat در چغندر قند کمک کنند. امروزه گیاهان زراعی مانند سویا، ذرت، پنبه، منداب و چغندر قند که متحمل به گلیفوسات Glyphosat هستند، به فراوانی کاشته می شوند.

سیستم لیبرتی لینک (LibertyLink)، جایگزین دیگری است که گیاهان متحمل به علف کش گلو فوسینات Glufosinat را ارائه می دهد.

آمونیم گلو فوسنات (Glufosinat-Ammonium) سبب آزاد کردن ماده (PPT) غیرانتخابی علف کش (L-Phosphinothricin=PPT) در گیاه می شود و آن هم نیز گلو تامات Glutamat را که سبب جلوگیری از ساختن آنزیم گلو تامین می شود (Glutamine) را غیرفعال می کند.

به این ترتیب پس از پاشیده شدن علف کش، مقدار آمونیاک سمی در سلول افزایش می یابد و علاوه بر تولید آمونیاک، فتوسنتز گیاه مختل و از تشکیل گلو تامین هم جلوگیری می شود. تحمل پذیری به علف کش گلو فوسنات Glufosinat از طریق انتقال ژن *pat* از باکتری های استرپتومایسس در خاک مانند *Streptomyces viridochromogenes* یا *Streptomyces hygroscopicus* به دست می آید که برای آنزیم PAT - پی پی تی ترانسفراز

(PPT-Acetyltransferase) کد شده است و سبب غیرفعال شدن یا تبدیل این آنزیم به آستیل در گیاهان تراژن می شود. این نوع تحمل پذیری به گلو فوسینات در خیلی از گیاهان زراعی مانند منداب متحمل به علف کش به کار رفته است بروموگسنیل Bromoxnil. این تحمل پذیری بر اساس انتقال ژن های *bxn-gens* از *Klebsiella pneumoniae* زیرگونه *ozanae* ناشی می شود. بروموگسنیل Bromoxynil و ایوگسینیل Ioxynil جزء بنزونیتریل ها Benzonitril هستند که خاصیت بازدارندگی در واکنش Hill-reaction در سیستم Photosystem II را به عهده دارند.

جدول شماره 3 : مهم ترین تراژن های متحمل به علف کش ها یا گیاهانی که به صورت سنتی متحمل به علف کش ها تهیه شده اند (AGBIOS Database 2006)

علف کش	نوع علف کش و نام تجارتی	نوع گیاه	تاریخ ثبت
<i>Herbicide Tolerant = HT</i> تهیه شده با تراژن ها <i>Transgenic herbicide</i>			
Glyphosat	تحمل پذیری با ترکیب EPSP از <i>A. tumefaciens</i> (Roundup Ready)	منداب، چغندر، پنبه، ذرت، سویا، چغندر قند	Monsanto 1995
Glufosinat	ژن های <i>pat</i> از <i>Streptomyces viridichromogenes</i> یا <i>S. hygrosopicus</i> (LibertyLink)	منداب، چغندر، پنبه، ذرت، برنج، شیکوری، سویا، چغندر قند	Bayer (Aventis) 1995
Bromoxynil , Ioxynil	ژن های <i>bxn</i> از <i>Klebsiella pneumoniae</i> ؛ Nitrilase hydrolyzed Oxylin	منداب (<i>Brassica napus</i> L.) پنبه	Aventis 1997 Calgene 1994
Sulfonylharnstoffe (Triasulfuron, Metsulfuron)	انتقال ژن های S4-HrA برای ALS فشرده intensive	پنبه کتان سویا	Dupont 1996 Univ Saskatoon 1996
<i>Herbicide Tolerant = HT</i> تهیه شده با روش های معمولی (<i>conventional</i>)			
Sulfonylharnstoffe	تلقیح با موتاسیون اکتسابی HT با شیمی	پنبه کتان سویا	Dupont 1996 Univ Saskatoon 1996
Imidazolinon	سللکسیون میکرواسپرهای موتاسیون شده و تلقیح در نوع (Clearfield)	منداب، ذرت، گندم،	Pioneer Hi-Bred 1995 BASF 2002

خاصیت مخصوص آن ها در علف کشی انتخابی دولپه ای ها *Dikotyle* می باشد. ژن های *bxn-gens* با هدایت یک پیشبر (promoter) به نام 35S برای کد کردن آنزیم نیتریلاز Nitrilase به کار گرفته می شود. این آنزیم سبب می شود که ماده علف کش به مواد غیر رسمی تجزیه شود. در تجزیه

روغن منداب های متحمل به علف کش بروموگسنیل bromoxynil هیچ اثری از آنزیم Nitrilase به اثبات نرسیده است.

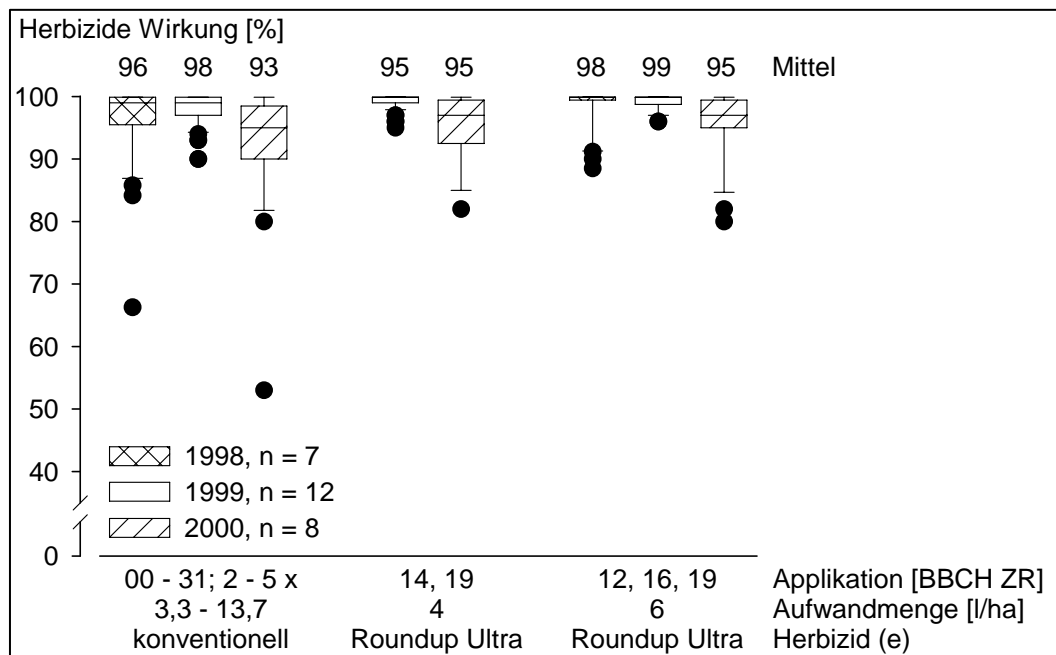
گیاهان متحمل به علف کش هایی با ترکیبات سولفونیل اوره **Sulfonylurea** به دو طریق سنتی و تراژن به دست می آیند. در نوع سنتی، تلقیح موتانت های متحمل به علف کش، که موتاسیون آن ها با کاربرد شیمیایی به دست می آید، (موتاسیون اکتسابی) انجام پذیر است. در نوع گیاهان تراژن متحمل به سولفونیل اوره مانند سویا یا پنبه، تحمل پذیری آن ها از طریق تبدیل (transformation) ژن های S4-HrA-gens به دست آمده است. این ترکیبات در توتون جهش زا بوده اند و با تغییر مسیر تشکیل دواسید آمینه ی ALS یا سنتز آستولاکتات (Acetolactat-synthase) کد شده اند و خاصیت بازدارندگی در مقابل سنتز آستولاکتات را دارند. آستولاکتات ALS، یک آنزیم کلیدی در انشعاب سنتز اسید آمینه ها مانند (Isoleucin ،Leucin ،Valin) می باشد. گیاهان متحمل به علف کش امیدازلینون **Imidazlinon** با روش سنتی به دست آمده اند که از سال 1992 در مزارع مختلف مصرف می شوند (Tan et al., 2005). گیاهان متحمل به علف کش امیدازلینون، از انتخاب گیاهان متحمل به علف کش ها که با تریتمان شیمیایی جهش پیدا کرده اند و با تلقیح آن ها با گیاهان زراعی به دست آمده اند. ارقامی که تحت نام تجاری (Clearfield) فروخته می شوند، متحمل به Imidazlinon امیدازلینون هستند. این تحمل به دلیل بازدارندگی در تشکیل AHAS اسید آستوهیدرواکسیل (Acetohydroxyacid-Synthase) و بازدارندگی تشکیل آستولاکتات Acetolactat-Synthase است که آنزیم ALS هم نامیده می شود. این آنزیم ها مسئول انشعاب اسید های آمینه هستند. تحمل پذیری در مقابل Imidazlinon بر اساس ژن های استحاله به آنزیمهای AHAS پایه گذاری شده است که به صورت سنتی از تلقیح این استحاله ها به دست آمده اند (جدول شماره 3).

چغندر قند های متحمل به علف کش ها

علف های هرز در مزرعه چغندر قند (*Beta vulgaris L.*) سبب تنزل شدید محصول می شوند. چغندر کاری های سنتی نیازمند 100% سم پاشی با علف کش ها هستند. زیرا خاصیت علف کشی سموم در مقابل علف های مختلف متفاوت است، در مبارزه با علف های هرز از مخلوطی از علف کش ها استفاده می شود. این سم پاشی ها معمولاً 3-5 مرتبه تکرار می شود. عملیات مبارزه با علف های هرز برای پیش از دوبرگه شدن چغندر شروع می شود. اگر مقدار مصرف علف کش ها بالا رود

مخصوصاً در شرایط نا مساعد هوا، می تواند موقتا در رشد چغندرها و در نتیجه در محصول اثر منفی بگذارد.

برای انواع چغندر قند های تراژن متحمل به علف کش های گلیفوسینات Glufosinat و گلیفوسات Glyphosat در سال 1998 تقاضای ثبت و کسب مجوز گردید. مجوز به علف کش راوندآپ (Roundup) گلیفوسات با مشخصات چغندرهای تغییرژن داده (ترا ریخته)، با حداکثر مصرف 6 لیتر در هکتار صادر شد (Märlander, 2005). با این مجوز در یک پروژه سراسری آلمان بررسی نحوه استفاده، تعداد سم پاشی، قدرت علف کشی و توانایی انتخابی (selectivity) و تأثیر در تغییرات محصول (yield tolerant) آغاز شد (Märlander & Bückmann, 1999). این آزمایش ها و ارزشیابی آن ها در سال 2000 متوقف و تقاضای ثبت آن به عنوان علف کش در انواع چغندرهای آزمایش شده به عنوان متحمل به فناوری گلیفوسینات Glufosinat از طرف کشاورزان و شرکت های دیگر، پس گرفته شد. نهایتاً بعضی از آزمایش ها برای بررسی سیستم کاشت ویژه و استفاده از راوندآپ (Roundup) تا 2002 ادامه داده شد (Petersen & Röver, 2005)



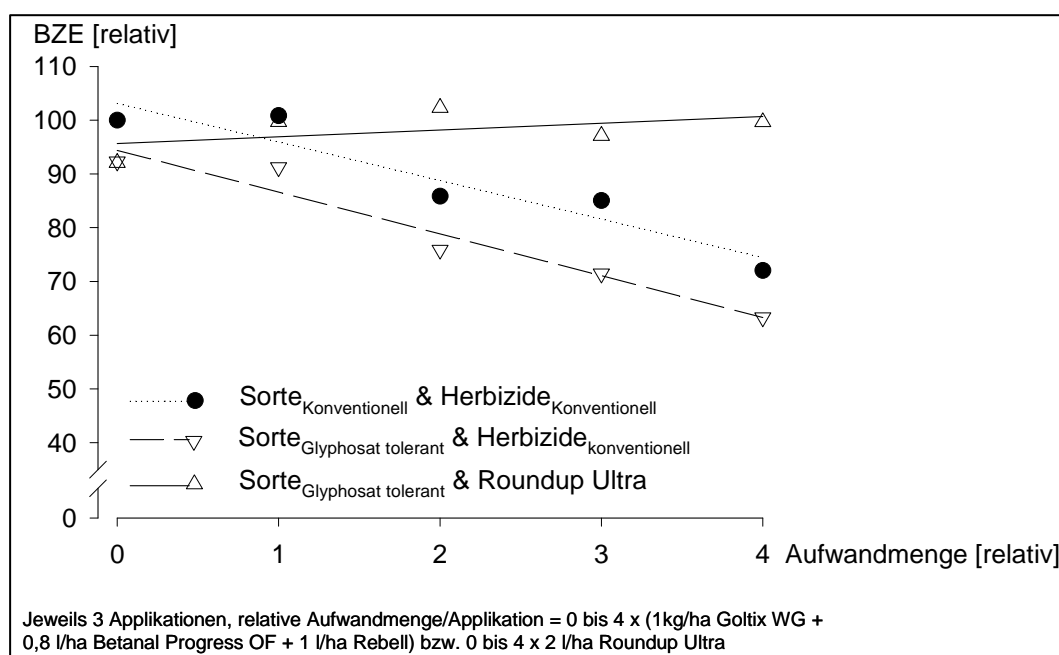
شکل شماره 2 : اثر علف کشی راوندآپ با دو مرتبه سم پاشی

(- محور افقی مقدار مصرف علف کش به لیتر در هکتار در روش سنتی و راوندآپ

- محور عمودی درصد تأثیر علف کش)

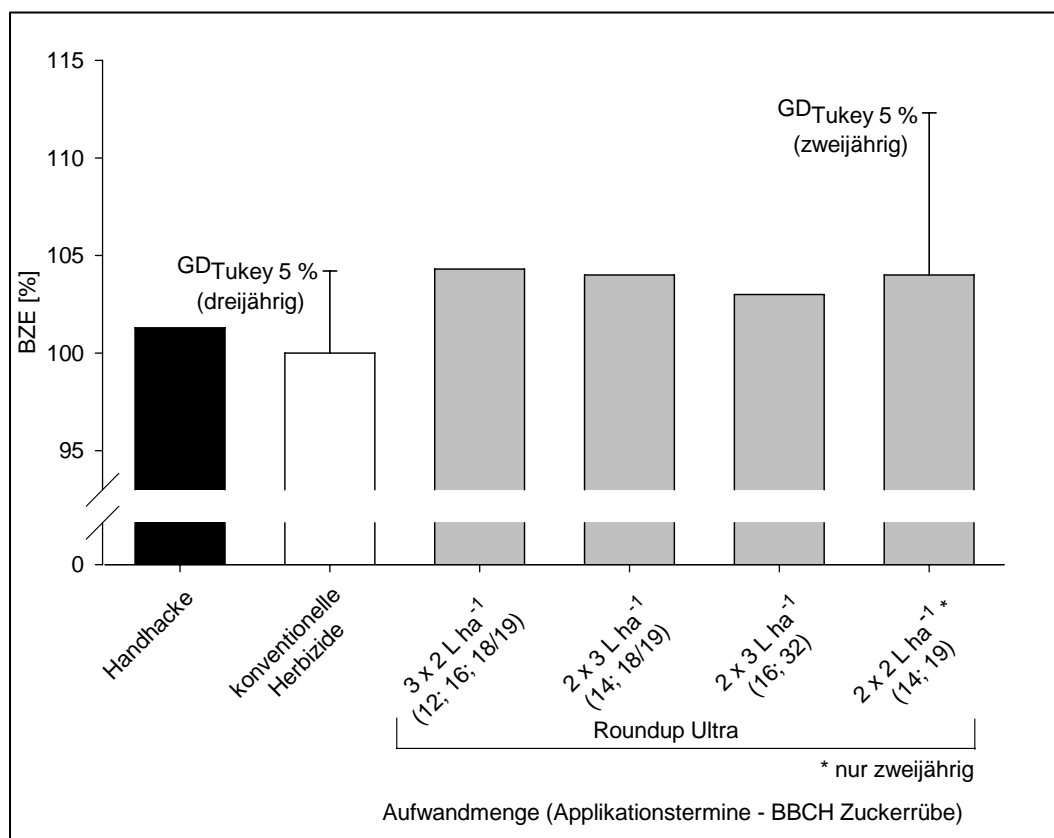
تأثیر علف کشی راوندآپ، با دومرتبه تکرار، بسیار بالا و نظیر علف کش های معمولی است (شکل 2). سم پاشی را می توان دیرتریعی در وضعیت 4-6 برگه شدن چغندرها (BBCH 14/16) با مقدار 4 تا 6 لیتر در هکتار (1.44 تا 2.16 لیتر) شروع کرد. اثر علف کشی راوندآپ بر روی تمام علف های هرز به یک اندازه و با درجه بالا است. لذا علف هرزهای مشکل زا را هم می توان با راوندآپ کنترل کرد. در مزرعه چغندر قند که در آن هم زمان گیاهان خود رو دیگری مانند منداب و غلات و سیب زمینی وجود دارد یعنی یک مزرعه مخلوط Mulchsaat است میتوان از تیمار راوند آپ (Roundup) در اول فصل صرف نظر کرد. علف کش راوندآپ را می توان برای مبارزه با علف هرزهای قدیمی و تازه رشد کرده دیرتر به کاربرد.

مبارزه با بعضی از علف هرزها که با علف کش های معمولی غیر ممکن است و حتما باید با دست وجین شوند با راوندآپ به راحتی امکان پذیر است. در مزارع چغندر قند های ترا ریخته باید ساقه های بذری را با دست چید تا از تلقیح ارقام ترا ریخته متحمل به علف کش ها، با چغندرهای



شکل شماره 3 : قند خالص با درجه خلوص نسبی (BZE) ارقام چغندر قند های معمولی و ارقام تراریخته متحمل به گلیفوسات Glyphosat در رابطه با مصرف متفاوت علف کش ها در منطقه نیدرینزا در شمال آلمان (Niederjens) سال 1998 (Beißner 2000)

خودروجلوگیری شود. اثر علف کش گلیفوسینات شبیه علف کش های معمولی است که در مبارزه با بعضی از علف هرزهای مخصوص مانند *Cirsium arvense* (L.) Scop. با مشکل مواجه هستند (Dietsch, 2002). توانائی انتخابی (**selectivity**) راوندآپ در ارقام ترا ریخته محتمل به گلیفوسات Glyphosat بسیار بالا است. حتی در صورت مصرف زیادی این علف کش تأثیری در کاهش محصول ندارد (شکل شماره 3). برعکس در علف کش های معمولی در اثر مصرف بیش از حد مجاز، یا استفاده از آن ها بعد از باران زیاد یا سم پاشی در تابش شدید آفتاب، سبب کاهش محصول می شود. کاربرد راوندآپ به علت توانائی انتخابی آن، سبب می شود به صورت غیرمستقیم قند خالص چغندر در حدود 5% افزایش نشان دهد (شکل شماره 4). اثر افزایش قند خالص در مصرف راوند آپ بازم بیشتر می بود اگر از علف کش های سنتی در مبارزه با علف های مشکل زا استفاده می شد (May, 2000). اثر انتخابی علف کش گلیفوسینات (Glufosinat) در ارقام ترا ریخته متحمل به گلیفوسینات، بهتر از علف کش های معمولی است، اما پاسخ گوی اثر انتخابی مطلق گلیفوسات (Glyphosat) نیست (Dietsch, 2002).



شکل شماره 4 : قند تصویه شده (BZE) چغندرهاى ترا ریخته متحمل به علف کش گلیفوسات (Glyphosat) در رابطه با کنترل علف کش ها در آلمان در سال های 2000-1998 (n= 24)

عرضه تجارتي ارقام تراريخته متحمل به علف کش گلیفوسات، در آمریکا به خوبی پيشرفت کرده است. کلیه امور مربوط به مجوزهای کاشت، تهیه فرآورده های محصول و استفاده از ارقام چغندر قند تراريخته متحمل به گلیفوسات برای مواد غذائی و خوراک دام در آمریکا تمام شده است.

همچنین مجوز استفاده غذائی و خوراک دام در کشورهای صادرکننده مهم قند مانند کانادا، ژاپن و مکزیک برای ارقام تراريخته متحمل به علف کش گلیفوسات صادر شده است.

عرضه ارقام تراژن به کشاورزان در آمریکا شروع شده است و پيش بينی می شود تا سال 2008 به همه مناطق کشت گسترش یابد. تجربه های اولیه در کاربرد سیستم این فناوری مزایای کاملاً روشن آن را نشان می دهد. دوبار استفاده از اوندآپ، موفقیت زیادی در مبارزه با علف های هرز نشان داد. تقاضا برای خرید و استفاده از این فناوری در بین کشاورزان بسیار بالا است زیرا علاوه بر تأثیر مثبت در مبارزه با علف های هرز، استفاده از این سیستم راحت تر و زمان سم پاشی آن با انتخاب کشاورز میسرتر است.

در محاسبه هزینه اختلاف درآمد برای کاشت ارقام تراژن بایستی غیر از افزایش محصول، به صورت غیر مستقیم بهتر شدن اثر انتخاب، تغییر قیمت علف کش ها و هزینه های عملیات اجرائی و کار مزد تهیه فناوری هم مورد توجه قرار گیرند. کار مزد تهیه فناوری تاکنون کاملاً مشخص شده است اما به علت مزایای زیاد اقتصادی راونداپ نباید این هزینه را دست پائین گرفت. با وجود این می توان در استفاده از مزایای کاشت گیاهان تراژن، 200 یورو در هر هکتار در آلمان برای کاربرد این فناوری قبول کرد (Märlander, 2005). با محاسبه 200 یورو در هر هکتار، هزینه پرداختی برای این فناوری برای کل سطح زیرکشت در اروپای مرکزی مبلغی در حدود 180×10^6 یورو برآورد شده است (Gianessi et al., 2003).

با مصرف حداکثر 6 لیتر در هکتار از راونداپ (معادل 2.14 کیلوگرم)، مقدار مصرف علف کش های معمولی به یک کیلوگرم در هکتار کاهش می یابد. ولی اهمیت مهم و مثبت آن در مسمومیت اکولوژی است. با توجه به نمودارهای مدل SYNOPS 2 و PELMO 3.20، مصرف راونداپ در 10 واحد زارعی در آلمان در مقایسه با علف کش های معمولی، خطرات کمتری برای آلودگی محیط زیست و ریسک بیولوژیکی در آب های زیرزمینی داشته است (جدول شماره 4). از طرف دیگر با به کار بردن راونداپ در مزارع مخلوط با گیاهان زراعی خود رو (Mulchsaat) و رشد آن ها تا 8-10 برگی سبب افزایش توازن زیستی شده است (Dewar et al., 2000).

جدول شماره 4 : تأثیر نموداری علف کش های معمولی و علف کش گلیفوسات (Glyphosat) در چغندر قندهای متحمل به گلیفوسات در محیط زیست (Märländer *et al.* 2003 ; Data) (changed after Dietsch, 2002)

Applikation	Herbizid Dosis [g a.i. ha ⁻¹]*							
Konventionell	1778 - 5651							
Glyphosat	1440 - 2160							
Simulierte Umweltwirkung (Modell SYNOPSIS 2)								
	Boden [%]†		Oberflächenwasser [%] †		Chronisches biolog. Risiko†			
	A	PEC _L	A	PEC _L	e	d	a	f
Konventionell	100	100	100	100	100	100	100	100
Glyphosat	0	13-68	0	8-53	3-9	0	0	0-1
Simulierte Umweltwirkung (Modell PELMO 3.20)								
	Unterboden Kumulierter Wirkstoff-eintrag [g a.i. ha ⁻¹ (2 Jahre) ¹]				Sickerwasser Wirkstoffkonzentration [µg a.i. l ⁻¹ ; 2. Jahr nach der Applikation]			
Konventionell	6,0 x 10 ⁻⁸ – 1,9 x 10 ⁻¹				0 – 5,8 x 10 ⁻²			
Glyphosat	0				0			

* a.i. = aktiver Wirkstoff, † 100% bezieht sich auf den errechneten Höchstwert. A = Anlagerung an die Bodenmatrix, PEC_L = Long-term Predicted Environmental Concentration (vorhergesagte Umweltkonzentration in den oberen 2,5 cm des Bodens innerhalb von 2 Jahren nach Applikation, e = Regenwurm, d = Daphnie, a = Algen, f = Fische.

ذرت و منداب متحمل به علف کش

در سال 2005 در حدود 4.6 میلیون هکتار منداب از ارقام تراریخته متحمل به علف کش ها در زیرکشت بود سطح زیرکشت ذرت با ارقام تراژن متحمل به علف کش ها معادل 3.4 میلیون هکتار بود که به این مقدار باید ارقام ذرت تراژن با ترکیبی از حامل بی - تی (Bt) و متحمل به علف کش ها را، با سطح زیرکشت معادل 6.5 میلیون هکتار، اضافه کرد. در ارقام ذرت، مقاومت در مقابل حشره کش ها نقش مهمتری را بعهده دارد. در هر دو کشت منداب و ذرت، به صورت عمده از ارقام متحمل به علف کش های گلیفوسات (Glyphosat) و گلو فوسینات (Glufosinat) استفاده می شود. در کشورهای اتحادیه اروپا، تقاضای زیادی برای ثبت و صدور مجوز در دست بررسی است.

ذرت (*Zea mays* L.) تنها گیاه تراریخته مونوکوتیلدونی است که در سطح وسیعی کاشته می شود. مبارزه با علف های هرز ذرت به علت بلندی ساقه، رشد عمودی و رشد دیرتر، به صورت طبیعی مشکل است. غیر از آن بعضی از علف هرزهای مقاوم مانند *Panicaceae* به علت چندین سال استفاده از علف کش های انتخابی در مزرعه ذرت پایدار و متمرکز شده اند. ذرت یکی از زراعت های

بسیار دیر کاشت است و به حد کافی پوششی برای سطح مزرعه ایجاد نمی کند. اگر ذرت در شکل تک کشتی امروزی باقی بماند، نگهداری سطح خاک از نظر فرسایش، امکان پذیر نخواهد بود. برای اولین بار با نوآوری جدید با استفاده از علف کش های غیرانتخابی، کاشت انواع ذرت متحمل به علف کش ها و به علت پوشش سطح مزرعه با مخلوطی از گیاهان زراعی خود رو (Mulchsaat) در تمام طول سال، حفاظت از سطح خاک را ممکن می سازد. روش معروف ارزشیابی صحرائی (FSE = farm scale evaluation) در انگلستان نشان داده است که با استفاده از کاشت گیاهان به عنوان کودهای آلی سبب افزایش گیاهان وحشی (برای فلورای وحشی) و تنوع حشرات (فاونا) محیطی شده است که به صورت معنی داری مفید است (Perry et al., 2004). از سال 2000 تا 2002 با استفاده از کود های آلی، عملیات ارزشیابی صحرائی FSE در مزارع ذرت، منداب و چغندر قند، وسیعترین تحقیقات برای بررسی اثرات کاشت ارقام متحمل به علف کش ها در اروپا صورت گرفته است. از نتیجه این بررسی ها و استفاده از داده های جمع آوری شده، هیچ گونه اثرات سوئی از کاشت تراژن ها در سیستم اکولوژی مشاهده نشده است (Andow, 2003 ; Champion et al., 2003; Squire et al., 2003).

کاشت ارقام تراژن منداب (*Brassica naapus L.*) متحمل به علف کش ها از سال 1995 در کانادا شروع شد (Stringam et al., 2003). زیرا تبدیل و تهیه تراژن منداب ساده تر است، لذا منداب جزء اولین گیاهان زراعی است که تراژن های متحمل به علف کش برای این گیاه تهیه شد. در حال حاضر سطح زیر کشت منداب تراژن در کانادا 60% کشت منداب را به خود اختصاص می دهد. در کانادا علاوه بر راونداپ (Roundup Ready)، لیبیرتی لینک (LibertyLink) ارقام متحمل به بومواگسنیل Bomoxynil که معروف به (Navigator) و ارقام مقاوم به ایمیدازولینون Imidazolinon معروف به (Clearfield) که با روش سنتی تهیه شده است)، هم کاشته می شوند. هیبرید بعضی از ارقام متحمل به گلوکوسینات با تراژن نرهای عقیم ترکیب شده اند. انتخابی که با کمک علف کش های متحمل بوجود آمده است بسیار مورد رضایت است. بررسی های انجام شده در کانادا از سال 1997-2000 نشان می دهد که در اثر استعمال علف کش های متحمل محصول منداب به مقدار 7-13% افزایش داشته است، علاوه بر محصول، درصد روغن منداب و مقدار پروتئین آن نیز بیشتر از ارقام معمولی بوده است (Stringam et al., 2003).

در مناطق کشت منداب مشکلات حفاظت خاک در مزارع منداب زمستانی مشاهده نمی شود. اما در سراسر دنیا کاشت منداب تابستانی ارجعیت دارد و با ترکیبی از کود آلی و علف کش های غیرانتخابی مزیت زیادی را ارائه می دهد. در مزارع منداب هم مانند ذرت تعدادی از علف های هرز

دائمی شده اند که با علف کش های معمولی مبارزه با آن ها بسیار مشکل است. از انواع این علف ها از خانواده *Cruciferae* و علف هرز *Capsella burda- pastoris* را می توان نام برد. از این نظر فناوری ارقام متحمل به علف کش مزیت زیادی داشته که در بررسی های انجام شده در کانادا این فناوری مورد تأیید قرار گرفته است. باید توجه زیادی به گرده افشانی منداب های تراژن و تلقیح با منداب های غیر تراژن و علف های وحشی قابل تلقیح مبذول شود. گزارش هایی در مورد چگونگی این تلقیحات، درصد انتشارگرده و تعیین فواصل مزارع وجود دارد (Weekes et al., 2005).

در آلمان مجوز برای کاشت ارقام تراژن متحمل به علف کش ها موقعی داده خواهد شد که بررسی چگونگی این تلقیحات درصد انتشارگرده و تعیین فواصل مزارع و مقدار ارقام مخلوط پایان گرفته باشد.

مقایسه سیستم در مورد تولید محصول و درآمد ناشی از کاشت ارقام تراژن با ارقام معمولی، از آن جهت مشکل است که ارقام تراژن در زمینه های تولید محصول دارای تفاوت های ژنتیکی هستند. حتی اگر ارقام دارای ژنوتیپ های مشابه باشند، محاسبه اثرات علف کش های انتخابی در مقدار محصول ارقام معمولی مشکل است. حتی مقایسه نتیجه بررسی استفاده از علف کش های انتخابی در مقابل علف کش های معمولی مجاز نمی باشد. زیرا این نتایج مربوط به علف کش های است که از نظر سمیت به محیط زیست و از نظر سم شناسی خواص متفاوتی دارند. بر طبق این اصل، هنوز مشخص نیست که چه مقدار از علف کش های گلیفوسینات و گلیفوسات را باید به جای علف کش های معمولی به کار برد. این نوع مقایسه ها به صورت اصولی ناقص است، زیرا اثرگذاری را فقط به تراژن های مخصوص محدود کردن کافی نیست بلکه باید با انواع مشابه یا قوی تری مقایسه شود. این موضوع خطاری است که از در نتیجه استفاده ی یک طرفه از علف کش های غیرانتخابی ممکن است مقاومتی در گیاه در مقابل تحمل پذیری علف کش ها (herbicide tolerance) بروز کند. امکان بروز چنین مشکلاتی وجود دارد اما خطرات عمده ای برای فناوری علف کش های متحمل ایجاد نمی کند. چنین امکانات مشابهی هم ممکن است در تنوع زیستی بوجود آید. مشکلی هم ممکن است در ارزشیابی اثرات اکوسیستم بوجود آید بدون این که مسئولیت این اثرات را بر عهده ی علف کش های غیرانتخابی گذاشت.

از این رو ارزشیابی اقتصادی و اکولوژی فناوری علف کش های متحمل می تواند از راه مقایسه سیستم ها به هدف برسد. تعیین اندازه اقتصادی بودن درآمد ویژه بدون هزینه باید وجود داشته باشد تا کشاورز بتواند به دست آورد. برای تعیین اثرات اکولوژی روش های سیستم اندازه گیری کمیته مانند PELMO، IPEST، SYNOPS لازم است که در مورد چغندر قند شرح داده شد.

چشم انداز آینده :

کشت ارقام متحمل به علف کش ها همراه با علف کش های غیرانتخابی می تواند سهم مهمی در نوآوری حفظ نباتات داشته باشد که به صورت واضح از نظر اقتصادی (اقتصادی کار) و مزایای اکولوژیکی سود مند است. تجربه چند ساله عملی کشت بیش از 70 میلیون هکتار در آمریکا و در سایر کشورهای مهم جهان این مزایا را تأیید می کند. از نظر دفع آفات تلفیقی زمینه های جدیدی را در انتخاب آستانه خسارت (threshold) پیش رو می گذارد. امکان استفاده دیرتر و با مقدار کم مصرف علف کش ها، از نظر اکولوژی هم از جزء مزایای این فناوری است. خواص سم شناسی و سمی بودن دو علف کش مهم گلیفوسات Glyphosat و گلو فوسینات Glufosinat در اکولوژی، متناسب با محیط زیست می باشد. اثر نوآوری تکنولوژی علف کش های متحمل HT (Herbicide Tolerant) و تطبیق آن با حفظ نباتات مدرن هیچ جای تردیدی باقی نمی گذارد. با وجود مزیت ارقام متحمل به علف کش ها برای کشاورزان و محیط زیست، مصرف کنندگان اروپائی به این تکنولوژی با نظر تردید نگاه می کنند.

Literatur

- Andow, D.A., 2003: UK farm-scale evaluations of transgenic herbicide-tolerant crops. *Nature Biotechnology* 21, 1453-1454.
- Agbios database, 2006: <http://www.agbios.com>
- Beißner, L., 2000: Einfluss von Herbiziden auf Stoffwechsel und Ertragsbildung von Zuckerrüben. *Zuckerindustrie* 125, 721-726.
- BMVEL–Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, 2004: Reduktionsprogramm chemischer Pflanzenschutz. Internet: http://www.bmelv.de/cln_044/nn_751174/SharedDocs/downloads/04-Landwirtschaft/Pflanzenschutz/Reduktionsprogramm_20chemischer_20Pflanzenschutz,templateId=raw,property=publicationFileEscherichiapdf/Reduktionsprogramm%20chemischer%20Pflanzenschutz.pdf, Stand: 31.07.2006.
- Champion, G. T. et al. 2003: Crop management and agronomic context of the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Phil Trans R Soc Lond B* 358, 1801-1818.
- Dewar, A.M., May, M.J., Woiwod, I.P., Haylock, L.A., Champion, G.T., Garner, B.H., Sands, R.J.N., Qi, A., Pidgeon, J.D., 2003: A novel approach to the use of genetically modified herbicide tolerant crops for environmental benefit. *Proc R Soc Lond B* 270, 335-340.
- Dietsch, A., 2002: Rentabilität und Umweltverträglichkeit der Unkrautregulierung in gentechnisch veränderten herbizidtoleranten Zuckerrüben - ein Beitrag zur nachhaltigen Entwicklung des Zuckerrübenanbaus. Dissertation Universität Göttingen, Kinzel, Göttingen.
- Gianessi, L., Sankula, S., Reigner, N., 2003: Plant Biotechnology: Potential impact for improving pest management in European agriculturEscherichia Sugarbeet case study. NCFAP, Washington.

- James, C., 2005: Global status of commercialized Biotech/GM crops: 2005. ISAAA Briefs No. 34. ISAAA: Ithaca, NY.
- Märlander, B., C. Hoffmann, H.-J., Koch, ESCHERICHIA, Ladewig, R., Merkes, J., Petersen, and N., Stockfisch, 2003: Environmental situation and yield performance of the sugar beet crop in Germany: heading for sustainable development. *J Agron Crop Sci* 189, 201-226.
- Märlander, B., 2005: Weed control in sugar beet using genetically modified herbicide-tolerant varieties- a review of the economics for cultivation in Europe. *Escherichia J Agronomy & Crop Science* 191, 64-74.
- Märlander, B., Bückmann, H., 1999: Genetically modified varieties in Germany - status and prospects with special respect of a sustainable sugar beet cultivation. *Zuckerindustrie* 124, 943-946.
- May, M.J., 2000: Efficiency and selectivity of RR and LL weed control techniques compared to classical weed control systems. Proceedings IIRB 63rd Congress, Interlaken, 163-170.
- Perry, J. N., Firbank, L. G., Champion, G. T., Clark, S. J., Heard, M. S., May, M. J., Hawes, C., Squire, G. R., Rothery, P., Woiwod, I. P., Pidgeon, J. D., 2004: Ban on triazine herbicides likely to reduce but not negate relative benefits of GMHT maize cropping. *Nature* 428 (6980), 313-316.
- Petersen, J., A., Röver, 2005: Comparison of sugar beet cropping systems with dead and living mulch using a glyphosate-resistant hybrid. *J Agron Crop Sci* 191, 55-63.
- Squire, G.R. et al. 2003: On the rationale and interpretation of the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Phil Trans R Soc Lond B* 358, 1779-1799.
- Stringam, G.R., Ripley, V.L., Love, H.K. Mitchell, A., 2003: Transgenic herbicide tolerant canola – the Canadian experience. *Escherichia Crop Sci* 43, 1590-1593.
- Tan, S., Evans, R. R., Dahmer, M. L., Singh, B. K., Shaner, D. L., 2005: Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Escherichia Pest Manag Sci* 61, 246-257.
- Weekes, Deppe, C., Allnutt, T., Boffey, C., Morgan, D., Morgan, S., Bilton, M., Daniels, R., Henry, C., 2005: Crop-to-crop gene flow using farm scale sites of oilseed rape (*Brassica napus*) in the UK. *Transgenic Res* 14, 749-759.

گیاهان تراژن مقاوم به ویروس - مکانیزم و امکانات استفاده از آن ها

مارک واررل مان

Mark Varrelmann

Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung Pflanzenvirologie, Georg-August-Universität, Grisebachstr. 6, 37077 Göttingen & Institut für Zuckerrübenforschung, Abteilung Phytomedizin Hotenser Landstr. 77, 37079 Göttingen (mvarrel@gwdg.de)

پیشگفتار

در دنیا در حدود 450 گونه مختلف ویروس گیاهی وجود دارند که سبب بیماری های ویروسی در گیاهان می شوند (Soosaar et al., 2005). ویروس های گیاهی و اسید نوکلئیک های مهاجم از عوامل بیماریزا می باشند. ویروس های گیاهی پارازیت های اجباری هستند که برای ازدیاد و ایجاد بیماری، احتیاج به متابولیزم گیاه دارند. ویروس های گیاهی با تغییر مسیر برنامه متابولیزم گیاهی اسید نوکلئیک، پروتئین و سایر ترکیبات خود را می سازند و تغییراتی در فیزیولوژی و بیوشیمی میزبان خود بوجود می آورند. ویروس های گیاهی به عنوان عوامل بیماریزا، با چشم دیده نمی شوند اما خسارت زیاد آنها در میزبان قابل رویت است. بعد از قارچ ها و بیماری های قارچی، ویروس های گیاهی دومین عوامل مهم بیماریزا ی گیاهی محسوب می شوند (Agrios, 1998). تقریباً تمام گیاهان زراعی مورد عفونت ویروس ها قرار می گیرند. رشد گیاهان در اثر بیماری های ویروسی متوقف و کمیت و کیفیت محصول آن ها کاهش می یابد. اهمیت بیماری های ویروسی در چند مثال روشن تر می شود. ویروس تورم شاخه ی کاکائو (*Cacao swollen shoot virus* (CSSV) در آفریقا هر سال سبب کاهش 50000 تن کاکائو به رزش 28 میلیون دلاری می شود (Bowers et al., 2001). در 40 سال گذشته در حدود 1.9×10^8 اصله درخت کاکائو از بین برده شدند (Hull & Davies, 1992). در آسیا خسارت ناشی از عفونت ویروس گرد تونگروی برنج (*Rice tungro spherical RTSV*) *virus*، و ویروس باسیل مانند تونگروی برنج (*Rice tungro bacilliform virus*, RTBV) بالغ به 1.5 میلیون دلار در سال گزارش شده است (Hull, 2002). ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی (*Tomato spotted wilt virus* (TSWV) در گیاهان مهمی مانند توتون، گوجه فرنگی و بادام

زمینی تولید عفونت کرده و سالیانه در حدود یک میلیارد دلار خسارت بیماری آورد (Prins & Goldbach, 1998 ; Hull, 2002). با وجود این که با ناقل های ویروس های سیب زمینی بشدت مبارزه می شود ، خسارت اقتصادی به سیب زمینی در حدود 30 میلیون دلار در سال برآورد می شود (Schuchert et al., 1996). در اثر عفونت گندم و جو به ویروس کوتولگی زرد جو (BYDV *Barley yellow dwarf virus*) خسارت آن در مناطق کشت غلات در انگلیس معادل 1.1×10^7 پوند انگلیسی برآورد شده است (Hull, 2002). جابجائی و ترابری تولیدات های کشاورزی ، گیاهان و مواد گیاهی برای تکثیر در باغها و مناطق کشاورزی ، بیماری های ویروسی را بطور روزافزونی افزایش می دهد و خسارت زیادی به گیاهان و نهایتا به تولید آن ها وارد می کند (Agrios, 1998). سمی برای دفع آفت ویروس وجود ندارد؛ روی این اصل نمی شود بیماری های ویروسی را معالجه کرد. برای کاهش عفونت ویروس های گیاهی و مبارزه با آن ها باید با ناقل های حشره ای، قارچی و نماتودی آنها مبارزه کرد و میزبان های طبیعی آن ها را از بین برد (Haddidi et al., 1998). یکی از مهمترین گامها در مبارزه با ویروس ها تهیه مواد گیاهی عاری از ویروس است ، مخصوصا گیاهانی که با قلمه و قسمت های رویشی گیاه تکثیر می شوند. از راههای دیگر مبارزه با ویروس ها ، تهیه ارقام مقاوم به ویروس می باشد که از محیط بهتر حفاظت می کند و متناسب با آن است. لذا بهتر است گیاهان به شروع عفونت مقاوم باشند. تهیه یک گیاه ارزشمند مقاوم مورد نیاز کشاورزی از انواع وحشی آن با سلکسیون سنتی ممکن است ده ها سال طول بکشد و مستلزم صرف وقت و هزینه زیاد است. اصلاح گیاه مورد نیاز و پرمحصول ، با انتقال ژن های مقاوم طبیعی از گیاه وحشی به ژنوم گیاه مورد نظر با اصلاح نباتات سنتی سال ها طول می کشد. یک مثال در این مورد چغندر قند است . در اروپا از 1.6 میلیون هکتار زمین زیر کشت چغندر قند در حدود 38% آن با ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندر (*Beet nectotic yellow vein virus* (BNYVV) که خاکزاد است ، آلوده می باشد که سبب ایجاد بیماری مهم اقتصادی ریشه ریشی یا ریزومانیا (Rhizomania) می شود. از نشانه های بیماری بوجود آمدن مقدار زیادی ریشه ی نازک و ظریف است (Richard-Molard & Cariolle, 2001) .

بعلت کاهش بیش از 40% سطح زیر کشت چغندر قند ، کاشت اقتصادی چغندر فقط با ژنو تیپ های مقاوم ممکن است. منبع مقاومت چغندریک چغندر وحشی به نام *Beta vulgaris* ssp. *maritima* بوده که از مقاومت طبیعی آن برای اصلاح چغندر قند استفاده شده است. اصلاح این چغندر در سال 1970 شروع و تا پیدا کردن نوع زراعی قابل رقابت آن حدود 25 سال طول کشید (Bianchardi et al., 2002). اهمیت چغندر های مقاوم از این جا پیداست که در آلمان 65% سطح زیر کشت یعنی 400000 هکتار چغندر های کاشته شده مقاوم به ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندر (BNYVV) می باشد (گزارش شفاهی E. Ladewig, 2006). از 1990 به ژنوم تعداد زیادی از گیاهان، اسید

نوکلئیک ویروس (RNA) را منتقل کردند. این اسید نوکلئیک ویروس مانند اسید نوکلئیک خود گیاه در گیاه تکثیر و سبب جلوگیری از عفونت ویروس می شود. این فناوری زیستی را خاموش سازی آر.ان.ای (RNA-silencing) می نامند. در این سیستم قبل از آن که ویروس بتواند در گیاه آلودگی ایجاد کند در مقابل آن مقاومت نشان می دهد. این روش از امکان یک رشد بسیار بالایی برخوردار است و می تواند مشکلات عفونت ویروسی را بطور ممتد برطرف سازد. استفاده از این تکنولوژی ممکن است سبب چشم پوشی از مبارزه با ناقل های ویروس و کاهش استفاده از حشره کش ها شود. با این تکنولوژی ضرورتی ندارد اصلاح نباتات سنتی دنبال منابع طبیعی مقاومت در گیاهان وحشی بگردد و اقدام به تلقیح آن ها با ارقام زراعی کند ، بلکه ارقام با محصول دهی و صفات خوب ، مستقیماً و مؤثرتر ، با تراژن های مقاوم به ویروس بطور ساده تلقیح و سلکسیون می شوند. هیچکدام از منابع طبیعی مقاومت در مقابل پاتو ژن های گیاهی باندازه سیستم خاموش سازی آر.ان.ای (RNA-silencing) بررسی و جزئیات آن مورد مطالعه قرار نگرفته است.

در این مقاله مکانیزم خاموش سازی آر.ان.ای RNA-silencing و استفاده از راهبرد های مقاومت تراژن با ذکر مثال های روشن و با اصلاح نباتات سنتی مقایسه خواهد شد. علاوه بر آن مثال های دیگر از سایر تکنولوژی تهیه گیاهان تراژن ، مانند انتقال ژن های شناخته شده مقاومت (R-genes) در گیاهان، انتقال ژن آنتی بادی (پادتن) ویژه ویروس به گیاه ، موقعیت ، مزایا و معایب این فناوری ذکر و با اصلاح نباتات سنتی (conventional) مقایسه خواهد شد.

تاریخچه مقاومت اکتسابی به بیمارگر و دگرپادی (Cross Protection)

در گذشته با مایه زنی گیاهان با جدایه کم آزار ویروس که علائم بیماری ایجاد نمی کرد و صدمه ای هم به گیاه نه نمی زد، آنها را در مقابل عفونت سویه های پرآزار همان ویروس مصون نگاه می داشتند (McKinney, 1929). این روش دگرپادی نامیده می شد و عملاً در بسیاری از گیاهان با موفقیت صورت می گرفت ، مانند مصونیت در مقابل ویروس تریستزای مرکبات (*Cirus tristeza CTV*) ، *virus* ، مصونیت در مقابل ویروس موزائیک زرد کدو (*Zucchini yellow mosaic ZYMV*) ، *virus* ، درخیا و طالبی یا مصونیت در مقابل ویروس لکه حلقوی خربزه درختی (PRSV) ، *Papaya ringspot virus* (Costa & Müller, 1980 ; Matthews, 1991). از معایب این روش ، کاهش محصول در اثر عفونت گیاه با ویروس کم آزار و ایجاد کانون آلودگی دائم با استرین کم آزار ، خطر تبدیل استرین کم آزار به یک نوع پرآزار است. غیر از آن مایه زنی گیاهان با ویروس کم آزار مستلزم صرف وقت زیادی است. این دلایل باعث شد که دگرپادی در سایر گیاهان زراعی متداول

نشود. درحقیقت با راهبرد حفاظت تقاطعی ، از مکانیزم مقاومت خود گیاه که براساس فنآوری خاموشی آر.آن.ای (RNA-silencing) است استفاده می کردند ، که در آن گیاهان تراژن مقاوم به ویروس با انتقال ترادف ژن ویروس به گیاه میسر می گردد (Convey *et al.*, 1997 ; Ratcliff *et al.*, 1997). لئوبن اشتاین (Leobenstein) در سال 1962 نشان داد که فقط با مایه زنی پروتئین خالص شده ویروس موزائیک توتون (*Tobacco mosaic virus, TMV*) در گیاه ایجاد حفاظت می شود و اولین بار ر سانفورد و جانستون (Sanford & Johnston) در سال 1985 روش دیگری برای ایجاد مقاومت پیشنهاد کردند که عبارت بود از مقاومت مشتق شده از پاتوژن PDR (pathogen = derived resistance), پاتوژن را با تکنولوژی ژنتیکی وارد میزبان مربوطه کردند. وسیله انتقال باکتری *Escherichia coli* و باکتریوفاژ Q β بود. راهبرد این تحقیق انتقال پروتئین پوششی باکتریوفاژ Q β به ژنوم باکتری *Escherichia coli* بود که توانستند مقاومت علیه ویروس ایجاد کنند. این محققان توانستند اصول سیستم مقاومت به پاتوژن را از طریق وارد کردن ژن پاتوژن به میزبان و تکثیر این ژن منتقل شده توسط گیاه یک سیکل دائمی ازدیاد ژن پاتوژن در میزبان بوجود آورند.

ایجاد مقاومت در گیاهان با پروتئین مشتق شده از ویروس

پاول و همکاران (Powell *et al.*) اولین بار سیستم ایجاد مقاومت در گیاهان با پروتئین مشتق شده از ویروس را در سال 1986 تجربه کردند. آن ها پروتئین پوششی (Coat Protein = CP) را از ویروس موزائیک توتون (*Tobacco mosaic virus, TMV*) به گیاه توتون *Nicotiana tabacum* منتقل کردند و پس از مایه زنی توتون با TMV نوعی مصونیت در مقابل آن مشاهده کردند. این حفاظت در اثر مایه زنی اسید نوکلئیک (RNA) ویروس از بین رفت (Nelson *et al.*, 1987). پاول و همکاران (Powell *et al.*, 1990) در سال 1990 نشان دادند که علت مصونیت توتون در مقابل ویروس موزائیک توتون ، مربوط به پروتئین ویروس (CP) بوده است.

آزمایش های انجام شده با پروتئین ویروس موزائیک یونجه (*Alfalfa mosaic virus (AIMV)*) و ویروس ایکس سیب زمینی (*Potato virus X (PVX)*) (Loesch-Fries *et al.*, 1987) و (Hemenway *et al.*, 1988) نشان داد که مصونیت گیاه با غلظت پروتئین منتقل شده بستگی دارد. در PVX و AMV مقاومت ناشی از پروتئین ویروس در اثر مایه زنی اسید نوکلئیک از بین نرفت. این

نتیجه نشان می‌دهد که مکانیزم سیستم ویروس – میزبان می‌تواند متفاوت باشد (Fitchen & Beachy, 1993; Hemenway et al., 1988; Tumer et al., 1991). همینوی و همکاران (Hemenway et al., 1988) گمان می‌کنند که پروتئین پوششی ویروس در گیاهان تراژن سبب جلوگیری از آزاد شدن اسید ریبونوکلئیک می‌شود. یوسیو و لوش فریس (Yusibov & Loesch-Fries, 1995) ادغام پروتئین پوششی تراژن را با یک فاکتور میزبان قطعی دانسته و آن را مسئول از هم نگاه داشتن ترکیبات ویروس در سلول می‌دانند. این نظریه مورد تأیید وو و همکارانش (Wu et al., 1990) در مورد مقاومت اکتسابی ناشی از پروتئین TMV هم می‌باشد. گزارش دیگر نشان می‌دهد که فقط پروتئین خالص ویروس (CP) که قابلیت گردایش (assembling) دارد، سبب ایجاد مقاومت در ویروس موزائیک توتون شده است (Bendahmane et al., 1997). لذا، در ابتدا این مقاومت در گیاهان تراژن به عنوان مقاومت مشتق شده از پروتئین (CP) ویروس (coat protein-mediated resistance) شناخته شد (Fitchen & Beachy, 1993; Hackland et al., 1994; Lomonossoff, 1995). غیر از این، با استفاده از ژن‌های قابل ترجمه ویروس و تبدیل آنها به پروتئین‌های ناقص در گیاهان تراژن، مانند پروتئین حرکتی و رپلیکاز نیز می‌توان مقاومت اکتسابی ناشی از پروتئین را نشان داد. لاپی دات و همکارانش (Lapidot et al., 1993) نشان دادند که مقاومت در توتون‌های تراژن به TMV می‌تواند توسط یک پروتئین حرکتی ناقص بوجود آید و نه توسط پروتئین‌های سالم (intact). کوپرو همکاران (Cooper et al., 1996) نشان دادند که با پروتئین‌های ناقص حرکتی هم می‌توان مقاومت با طیف وسیع تری بوجود آورد. استفاده از پروتئین‌های حرکتی قابل ترجمه کامل، معایبی دارد چون امکان دارد در موتانت‌های ناقص سایر ویروس‌ها به کار گرفته شود. علاوه بر این مقاومت در گیاهان تراژن می‌تواند نه تنها توسط پروتئین‌های کامل، بلکه توسط پروتئین‌های ناقص حرکتی و رپلیکاز نیز به وجود آید (نقل از خلاصه مقاله Palukaitis & Zaitlin, 1997). این نویسندگان معتقدند که ادغام پروتئین‌های رپلیکاز با سایر پروتئین‌های ویروسی می‌تواند نقش بازدارندگی در تکثیر و انتشار ویروس‌ها داشته باشند.

بطور کلی مقاومت اکتسابی ناشی از پروتئین پوششی ویروس، فقط منجر به تأخیر ظهور علائم بیماری ویروسی و پائین نگاه داشتن غلظت ویروس در گیاه می‌گردد، و بندرت گیاه را مقاوم در مقابل عفونت ویروس می‌کند. پس از آن که فنآوری RNA-silencing با انتقال کامل ژن‌های قابل ترجمه ویروس و فنآوری ایجاد مقاومت ناشی از RNA کشف گرد، فنآوری تهیه گیاهان تراژن مقاوم به ویروس با پروتئین پوششی ویروس کنار گذاشته شد، چون مزیت چندانی نداشت.

علاوه بر آن پروتئین‌های فعال ویروس که در هر سلول گیاهی وارد می‌شوند دارای یک نقش زیستی (biological function) مانند تکثیر ویروس (Replication)، قابلیت انتقال ویروس با ناقل

(vector transmission) ، میزبانی (host range) ، بیماری زائی (pathogenicity) و یا مکمل شدن ناقص (defect complement) را دارند. همچنین وجود این پروتئینها ممکن است منجر به پیامدهایی از قبیل پوشش ناخودی (پوشیده شدن نوکلئیک اسید با پروتئین ویروس دیگر، heterogonous encapsidation) ، مکمل شدن (complement) و هم افزایی (synergistic) گردند (Tepfer, 2002) و لذا می توانند خطرات و ریسک های بیولوژیکی گیاهان تراژن مقاوم به ویروس باشند. این فنوتیپها (phenotype) قابل برگشت (reversible) هستند و تغییراتی در ژنوم ویروس های آلوده کننده نمی دهند.

مقاومت اکتسابی از راه فنآوری خاموش سازی آر.ان.ای (RNA-silencing)

مکانیزم

موجودات هسته دار (Eukaryote) که گیاهان هم جزء آن ها هستند مکانیزمهایی دارند که با بکارگیری آن می توانند خود را علیه ژن های غیرخودی مانند ویروس ها یا ترانسپوزون ها (Transposon ژن های جهنده یا قطعاتی از DNA که قادر هستند از مولکولی جدا شده و در مولکول دیگر ادغام شوند) حفظ کنند (Voinnet, 2001 ; Hamilton *et al.*, 2002). موضوع بحث این بخش مکانیزم خاموش سازی آر.ان.ای RNA-silencing است. در این مکانیزم ، اسید ریبونوکلئیک (RNA) خود گیاه ژن های غیرخودی را از فعالیت بازمی دارد و آن ها را تحت فشار قرار می دهد. این RNA گیاه از ادغام اسید ریبونوکلئیک ویژه گیاه و ناشی یا اکتساب از RNA می باشد (Baulcome, 2004, 2005; Filipowicz *et al.*, 2005). مقالات زیادی در مورد RNA-silencing در گیاهان منتشر شده است. از مهمترین این مقالات عبارتند از نشریات Lindbo & Dougherty, 2005; Dunoyer & Voinnet, 2005; Dudley & Goldstein, 2003; Susi *et al.*, 2004; Baulcombe *et al.*, 2004. این مکانیزم ، در گیاهان تراژنی کشف شد که ژن غیرخودی داشتند (van der Krol, 1990; Napoli *et al.*, 1990; Elmayer & Vaucheret, 1996). در ابتدا این پدیده به عنوان هم سرکوبی (Cosuppression) نامیده شد برای این که در اثر وارد کردن (expression) اضافی ژن گیاه بصورت تراژن هر دو ژن از فعالیت بازمی مانند (turn up). در مکانیزم RNA-silencing از ظهور صفات تراژن بطور موقت (temporary) و قابل برگشت (reversible) کاسته می شود ، برای این که نسخه برداری (transcription) تراژن از سوی گیاه ، به عنوان عمل اسید نوکلئیک مهاجم ویروسی شناخته می شود.

این مکانیزم در بیشتر ارگانیزم های هسته دار (Eukaryote) وجود دارد. مولکول آغاز کننده (initiator) این مکانیزم یک آر.ان.ای دولا (ds RNA) (Wesley *et al.*, 2001) است و خود اسید ریبونوکلئیک دولا هم ، از آر.ان.ای تک لای غیرخودی در سلول ، توسط آنزیم پلی مرز (RNA-polymerase) منسوب به RNA تولید می شود.

RNA-silencing با توالی RNA مهاجم خودی سلولی مقابله می کند . روی این اصل آنرا سیستم ایمنی خود گیاه هم می نامند . این سیستم مصونیت نه بر اساس پروتئین ، بلکه بر اساس RNA ایجاد می شود . این مکانیزم مقاومت اکتسابی علیه ویروس های گیاهی ، سبب انحطاط و از هم پاشیدن اسید ریبونوکلئیک ویروس های وارده می شود.

اسید ریبونوکلئیک دولا (ds RNA) با تکثیر ویروس (replication) از اسید ریبونوکلئیک ویروس (Virus-RNA) بطور موقت (temporay) تولید و بطور طبیعی سبب ایجاد این مکانیزم مقاومت علیه هر ویروس و در هر گیاهی می شود (Ding *et al.*, 2004). پروسه اسید ریبونوکلئیک دولا (ds RNA) توسط ژن های ریبونوکلئاز (DICER) خود گیاه ، در رشته های دولای کوتاه siRNA (short interfering RNAs) با پلیمریزه شدن 21 و 24/25 نوکلئوتید شکل می گیرد (Hamilton & Baulcome, 1999 ; Tang *et al.*, 2003).

رشته های دولای کوتاه siRNA در یک کمپلکس چند پروتئینی (multi protein complex) ادغام شده و (RISC) RNA-induced silencing complex نامیده می شود و دارای نوکلئاز مخصوص تردف هدف (sequence specific nuclease) می باشند (Hammond *et al.*, 2000). یک رشته کوتاه siRNA تک لای، توالی ویژه RNA با مکمل RNA را هیبرید می کند و انحطاط آن (degradation) با انحطاط نوکلئید داخلی شروع می شود (Elbashir *et al.*, 2001). دلیل مهم فعالیت ضد ویروسی مکانیزم RNA silencing در این است که در سلول بصورت دائم وجود ندارد، بلکه با وساطت یک سیگنال سیستمیک (شاید با انواع مختلف رشته های کوتاه siRNA) در سلولها بوجود می آید ، با کمک آوند ها از فاصله دور تر بطور سیستمیک در گیاه گسترش یافته و اثر می گذارد (Palauqui *et al.*, 1997 ; Voinnet & Baulcome, 1997; Baulcome, 2004 ; Voinnet, 2005). با وجود بودن این مکانیزم مقاومت اکتسابی ، همه گیاهان به خودی خود مقاوم به ویروس نیستند ، زیرا ویروس های گیاهی نیز برای دفاع از خود ، پروتئین می سازند که سیستم مقاومت RNA-silencing را کاهش می دهند (Silhavy & Burgyan, 2004 ; Voinnet, 2005). شاید در بیش از 12 جنس از ویروس ها ، پروتئین های کاهش دهنده سیستم مقاومت RNA-silencing ، ایزوله و شناسائی شده اند. باید توجه داشت که مکانیزم تخریب اسید ریبونوکلئیک (RNA-Degradation) مربوط به مکانیزم مقاومت به ویروس خود گیاه است (Silhavy &

Burgyan, 2004; Li & Ding, 2001 ; Voinnet et al., 1999 ; Moissiard & Voinnet (2004).

تهیه گیاهان تراژن مقاوم به ویروس با مقاومت اکتسابی اسید ریبونوکلیئیک (RNA)

بعد از تهیه اولین گیاه تراژن مقاوم به ویروس که با ژن های کامل قابل ترجمه ویروسی به دست آمده بود ، و تا حدودی هم مکانیزم مقاومت ناشی از پروتئین را نشان می دادند ، توانستند پدیده مقاومتی را کشف کنند که براساس وجود اسید ریبونوکلیئیک تراژن ویروس بود (Lindbo et al., 1993). لیندبو و دوورتی (Lindbo & Dougherty, 1992) و بول کوم (Baulcome, 1994) مقاومتی را هم با استفاده از ژن های ناقص و هم با استفاده از ژن های ترجمه نشده پروتئین ویروس (CP) بدست آوردند، بدون اینکه پروتئین ترجمه شده باشد. ضمناً توانستند یک رابطه معکوس هم بین ظاهر شدن صفات تراژن و مقاومت به دست آمده به اثبات برسانند. در این پدیده ، فقط آر.ان.ای های تراژن مسئول مقاومت بودند . لذا ، پیشنهاد کردند این مقاومت، مقاومت ناشی از RNA یا مقاومت مشتق شده از ویروس RmVR (RNA mediated virus resistance) نامیده شود. فون بول کوم (von Baulcombe, 1996) ابتدا یک مکانیزم کلی در گیاه طرح ریزی و آنرا (PTGS) = posttranscriptional gene silencing نامید. به علت وجود مکانیزم در انواع سلول های متفاوت (مانند گیاهان ، حشرات و قارچ ها) به پیشنهاد فون بول کام (von Baulcombe, 2004) این مقاومت بطور کلی RNA-silencing نامیده شد. این مکانیزم مقاومت RNA-silencing می تواند در گیاهان تراژن باشکال مختلف به وجود آید و منجر به بروز مقاومت با درجات متفاوت گردد. در اینجا ژن هائیکه بطور کامل ترجمه نمی شوند ، می توانند هم رشته های اصلی (sense) یا رشته های مخالف آنها (antisense) به گیاه وارد شوند. تحقیقات بعدی نشان داد که قطعات کوچکی از ژن هم (genes fragments) برای تولید مقاومت کافی است ، با این شرط که حداقل طول قطعه ژن ویروس 400 جفت باز (400 bps) باشد (Pang et al., 1997). یا این که اگر قطعه ژن ویروس کوتاه تر است یابستی طول آنرا با یک ترانسکرپت پایدار (silencer) DNA بیشتر کرد (Jan et al., 2000 a & b). مقاومت های به دست آمده متغییر هستند و به روش انتقال بستگی ندارند اما به محل قرار گرفتن تراژن (insertion) در ژنوم گیاه بستگی دارد . یعنی مقاومت متغییر است بین بهبودی (Recovery) و مقاومت ناشی از عفونت (Infection Resistance) (Hull, 2002).

در بهبودی (Recovery) گیاه، علائم بیماری پس از ظهور از بین می‌رود و شاخه‌هایی که بعداً رشد می‌کنند بدون علائم و عاری از ویروس هستند. مقاومت با طیف گسترده‌تر، از طریق RNA-silencing اعمال می‌شود که اختصاصی هر تترادف (Sequence specific) است. ویروس‌ها نیکه توالی تراژن آن‌ها بیش از 10% از هم متفاوت باشد در مکانیزم RNA-silencing شناخته نمی‌شوند (Prins, 2003). لذا قطعات پشت سرهم گونه‌های مختلف ویروس، تحت کنترل پیشبرگ‌های (promoter)، که زود تر شروع شده‌اند، شروع به تولید مقاومت می‌کنند. (Prins *et al.*, 1995; Jan *et al.*, 2000b). از مشکلات در تبدیل (transformation) مهندسی ژنتیک گیاه، تنها تنوع فرم‌های قابل انتخاب مقاومت نیست، بلکه تعداد فنوتیپ‌های تبدیل‌شدنی (transformant) مقاومت به عفونت است. این وضعیت را واترهاوس و همکاران (Waterhouse *et al.*, 1998) در موازات وارد کردن (expression) اسید ریبونوکلئیک ویروسی در توجیه نقش رشته‌های اصلی (sense) و رشته‌های مخالف آن (antisense) در بررسی‌های خود مشاهده کردند، که در داخل ژنگاه (Locus) تعداد زیادی از ژن‌های قابل انتقال مقاومت بر علیه عفونت وجود دارند. اسمید (Smith *et al.*, 2000) برای اولین بار تترادف‌های ژنی مشتق شده از ویروس را به صورت تکرار معکوس (inverted repeat) از محل اتصال غیر خودی (no homolog) جدا شده بودند برای وارد کردن (expression) به گیاهان تراژن بکار بردند. این تکرارهای معکوس (IR) سبب وارد شدن dsRNA خود تکمیلی (self complement) شد که اثر آن در مکانیزم ایجاد مقاومت خاموشی ژن بیشتر از رشته اصلی (sense) و رشته مخالف (antisense) است. مؤلفین موفق شدند در 100% ژن‌های منتقل شده (ترانسفورمانتها)، مقاومت را برقرار کنند. وسلی و همکارانش (Wesley *et al.*, 2001) توانستند نشان بدهند که حداقل طول اسید ریبونوکلئیک دولا ds RNA برای فراهم شدن مکانیزم خاموشی ژن بایستی 100 جفت باز (100 bps) باشد. در اثر بروز صفات ارثی در ds RNA با منشأ ویروسی یا بوجود آمدن آن‌ها، مکانیزم مقاومت خود گیاه قبل از عفونت به کار می‌افتد و می‌تواند مقاومت در مقابل تترادف ویژه عفونت آن ویروس ایجاد کند (Chen *et al.*, 2004; Helliwell & Waterhouse, 2005).

بیشتر ویروس‌های گیاهی دارای اسید ریبونوکلئیک (RNA) هستند. بیماری‌های مهم اقتصادی دیگری هم هستند که عامل آنها دارای DNA می‌باشند و از طریق ds RNA قابل تکثیر داخلی ازدیاد نمی‌شوند. روی این اصل آزمایش‌هایی برای درست کردن مقاومت از اسید ریبونوکلئیک RNA با مقاومت مشتق شده از ویروس RmVR در استفاده از آر.ان.ای پیک (mRNA) در هم‌رشته‌های اصلی (sense) یا رشته‌های مخالف آنها (antisense) در مقایسه با ویروس‌های آر.ان.ای دار ناموفق بوده است (Lomonossoff, 1995). وارد کردن پروتئین‌های کوتاه یا پروتئین‌هایی با

ساختار ناقص و ساختار غیر پروتئینی که در اثر گذاری متقابل تکثیر ویروس ها بوجود می آیند سبب ایجاد مقاومت در گیاهان می شوند (Duan *et al.*, 1997 ; Hong *et al.*, 1996 ; Noris *et al.*,) ، اما ، چون ژنوم ویروس های DNA دار هم صفات ارثی خود را از طریق mRNA بروزی می دهند، انتقال ژن های ویروسی از طریق رشته مخالف (antisense) مانند RNA خود ویروس موفقیت آمیز بوده است (Bendahmane & Gronenborn, 1997; Day *et al.*, 1991 ; Bejarano & Lichtenstein, 1994).

به طور خلاصه در حال حاضر مؤثرترین وارد کردن dsRNA از ژنوم ویروسی RNA یا آر.ان.ای پیک mRNA در مورد ویروس های DNA شکل اصولی برای تهیه گیاهان تراژن مقاوم به ویروس ها می باشد.

دوام و ریسک مقاومت ناشی از اسید ریبونوکلئیک (RNA)

عیب سیستم مقاومت مرتبط با خاموشی آر.ان.ای در کنار مزایای ویژگی بسیار بالای آن ، وجود ژن های ویروسی بازدارنده (suppressors) این سیستم است که احتمالاً بستگی به نوع فعالیت ویروسها دارد (Moissiard & Voineet, 2004). هر گیاه تراژن که دارای سیستم مقاومت RNA-silencing در مقابل یک گونه از ویروس است ، می تواند از طریق ویروس دیگری مورد عفونت قرار گیرد. اگر این ویروس جدید یک پروتئین بازدارنده همراه داشته باشد ، می تواند مقاومت سیستم خاموشی آر.ان.ای را تحت فشار قرار دهد و مقاومت را بی اثر کند. این وضعیت با آزمایش های متعددی با اثبات رسیده است (Mitter *et al.*, 2001 & 2003; Savenkov & Valkonen, 2001).

عفونت های چند گانه یک گیاه که ناشی از ویروس های متفاوت است در خیلی از میزبان ها دیده می شود. لذا خطر آلودگی گیاه تراژن که مقاومت آن برای همه این ویروس ها نیست، بسیار زیاد است ، مگر اینکه سیستم مقاومت خاموشی آر.ان.ای ایجاد شده در مقابل همه این ویروس های احتمالی تهیه شده باشد.

خطر بیولوژیکی دیگری که گیاهان تراژن را تهدید می کند امکان نوترکیبی (Recombination) ویروس ها در هر سلول گیاه تراژن است که دارای اسید ریبونوکلئیک ویروس است (Aaziz & Tepfer, 1999; Tepfer *et al.*, 2002). ویروس های نوترکیب می توانند بیماری را با یک کیفیت دیگری ایجاد کنند مخصوصاً اگر در انتخاب شدن در یک وضعیت بهتری قرار گیرند. امکان اینکه این که نوترکیبی نقش و وظیفه ای را همراه خود منتقل کند ، بستگی به طول ترادف در تراژن اصلی دارد

، این ترادف بایستی بتواند یک فعالیت بیولوژیکی را تعریف کند. همیشه احتمال بروز نوترکیبی در آلودگی های مرکب ویروسی در گیاهان تراژن وجود دارد. نوترکیبی در شرایط طبیعی تاکنون باثبات نرسیده است. موارد زیادی از تنوع طبیعی در ویروس ها وجود دارد که می توان آنها را به نوترکیبی نسبت داد.

کشت و تجارت گیاهان تراژن مقاوم به ویروس

پس از آنکه امکان تئوریک تولید گیاهان تراژن بر اساس ژنوم پاتوژن ها منتشر شد ، قدم مثبتی در راه تولید تراژن های مقاوم به ویروس محسوب گردید. مخصوصا در آمریکا ، گیاهان تراژن تعداد بیشماری گیاهان با اسید نوکلئیک های متفاوت ویروسی تهیه گردید و برای کشت آزمایش شد.

از سال 1994 که تراژن گیاهان مختلف در آمریکا اجازه کشت و معاملات تجاری یافتند تا کنون (یعنی مهرماه 1385) در تمام دنیا گیاهان تراژن که برای کشت اجازه یافته اند عبارتند از کدو ، خربزه درختی ، سیب زمینی مقاوم به ویروس موزائیک زرد کدو (*Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) ، ویروس موزائیک هندوانه (*Watermelon mosaic virus 2* (WMV2) ، ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus* (CMV) ، ویروس لکه حلقوی خربزه درختی *Papaya ringspot virus* (PRSV) ، ویروس برگ قاشقی سیب زمینی *Potato leafroll virus* (PLRV) و ویروس وای سیب زمینی *Potato virus Y* (PVY) . غیر از ایجاد مقاومت علیه ویروس برگ قاشقی سیب زمینی که از طریق بیان ژن رپلیکاز ویروسی به دست آمده است بقیه از طریق انتقال ژن قابل بیان پروتئین پوششی (CP) بدست آمده اند (; Tepfer, 2002 ; <http://www.nbiap.vt.edu/cfdocs/biopetitions2.cfm>) . آزمایش گیاهان تراژن مقاوم به ویروس گیاهان زارعی و باغی که با ژن های ویروسی مختلف تهیه شده اند ، انجام شده است.

بانک انترنتی سیستم اطلاعاتی برای بیوتکنولوژی <http://www.nbiap.vt.edu/cfdocs/fieldtests3.cfm> از جولای 2006 قابل استفاده در انترنت است. در این آدرس انترنتی نتیجه آزمایش 866 گیاه تراژن مقاوم به ویروس که از سال 1987 در آمریکا و در مزرعه و باغ برای کشت آزمایش شده اند ، دیده می شود. در جدول شماره 1 گیاهان تراژن مقاوم به بیماری های ویروسی نباتات زراعی مهم آزمایش شده را نشان می دهد . گیاهان انتخاب شده این جدول اهمیت فنآوری زیستی در تحقیقات و اصلاح نباتات مدرن گیاهان که شرایط استفاده از این فنآوری پیشرفته را داشتند به نمایش می گذارد.

جدول شماره 1 : گیاهان آزمایش شده تراژن مقاوم به ویروس و دارای اهمیت اقتصادی در آمریکا

گیاهان مختلف تراژنی	گیاه تراژن مقاوم به ویروس :
نخود	Alfalfa mosaic virus (AMV) Pea enation mosaic virus (PEMV)
بادام زمینی	Bean yellow mosaic virus (BYMV) Tomato spotted wilt virus (TSWV) Groundnut rosette assistor virus (GRAV) Potato spindle tuber viroid (PStV)
جو	Barley yellow dwarf virus (BYDV)
جو دوسر	Barley yellow dwarf virus (BYDV)
سیب زمینی	Potato virus Y (PVY) Potato leafroll virus (PLRV) Potato virus A (PVA) Tobacco etch virus (TRV)
ذرت	Maize dwarf mosaic virus (MDMV, MDMV-B) Maize chlorotic mottle virus (MCMV)
فلفل سبز	Cucumber mosaic virus (CMV)
آلو	Plum pox virus (PPV)
کاهو	Lettuce mosaic virus (LMV)
سوژا	Tomato spotted wilt virus (TSWV) Bean pod mottle virus (BPMV)
سیب زمینی شیرین	Soybean mosaic virus (SbMV, SMV) Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV)
گوجه فرنگی	Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) Potato virus Y (PVY) Cucumber mosaic virus (CMV) Tomato mosaic virus (ToMV) Beet curly top virus (BCTV) Tomato spotted wilt virus (TSWV) Tobacco mosaic virus (TMV) Alfalfa mosaic virus (AMV)
کلم	Cauliflower mosaic virus (CaMV)
انگور	Grapevine fanleaf virus (GFLV)
گندم	Wheat streak mosaic virus (WSMV) Barley yellow dwarf virus (BYDV)
نیشکر	Sorghum mosaic virus (SrMV)
چغندر قند	Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)

<http://www.nbiap.vt.edu/cfdocs/fieldtests3.cfm>

استخراج از سایت اینترنتی تیرماه 1385 (Juli 2006)

دلیل عدم استفاده تجارتي و عملي گیاهان تراژن مقاوم به ویروس ها زياد است.

از یکطرف عدم آمادگی مردم در قبول استفاده از گیاهان تغییرژن داده و تولیدات مواد غذایی و خوراک دامی این گیاهان است. بحث های سیاسی، اجتماعی و ریشه ای در این مقاله فنی جای ندارد. از طرف دیگر، درکاشت گیاهان تراژن مقداری ریسک و خطرات ناشناخته نهفته است. برای آشنا شدن با این خطرات به گزارش و مقاله های انتشارشده مراجعه شود (Tepfer & Balázs, 1997; Aaziz & Tepfer, 1999; Tepfer, 2002).

ایجاد مقاومت ویروسی در گیاهان تراژن از طریق بوجود آمدن پادتن های ویژه نو ترکیب

از مجموعه راهبرد های تهیه گیاهان تراژن می تواند یکی هم به وجود آمدن پادتن (آنتی بادی) نو ترکیب علیه ویروس ها نو ترکیبی باشد، به این صورت که پروتئین ویروسی به طور فیزیکی جذب آنتی بادی می شود و از تکثیر (replication) و تکمیل (complement) ویروس جلوگیری می کند. از سال 1993، تا لادوراکی و همکارانش (Tavladoraki *et al.*, 1993) با به وجود آوردن پادتن نو ترکیب بخش متغیر یک زنجیره (single chain Fragment variable, scFv) علیه تمبوس ویروس (Tombusvirus)، موفق شدند گیاه تراژن به دست آمده را تا حدودی مقاوم به عفونت ویروس، که پادتن علیه پروتئین پوششی آن ویروس بوجود آمده بود، نموده و بروز علائم بیماری را در آن به تأخیر بیندازند. تجربه مشابهی را هم، فکرو همکارانش (Fecker *et al.*, 1997) در توتون *Nicotiana benthamiana* با انتقال ژن تک زنجیره متغیر پادتن (scFv) علیه پروتئین پوششی ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندر (*Beet necrotic yellow* BNYVV) *vein virus*، به دست آوردند. اگر آنتی بادی scFv علیه پروتئین های ناقص ویروسی، مانند آنزیم های تکثیری ویروس (replication enzymes)، پلی مرز آر.ان.ای وابسته به آر.ان.ای (RdRP) یا پرتناز ویروسی (virus protease) به کار برده شوند، اثر جلوگیری از عفونت ویروس آن ها بیشتر و مؤثرتر است (Boonrod *et al.*, 2004; Gargouri-Bouzid *et al.*, 2006). پرینس و همکاران (Prins *et al.*, 2005) نشان دادند که چندین آنتی بادی را باید انتخاب و مقاومت توسط آن ها را قبلاً بررسی کرد، قبل از این که مقاومت مؤثر ویروسی علیه آنها بوجود بیاید. این راهبرد در مقایسه با فناوری ایجاد مقاومت از طریق RNA دارای معایبی است، برای این که میزان ایمنی، بعلت کمبود اطلاعات از مراحل زندگی ویروس های مختلف، غیر قابل پیش بینی است، چون خطرات بیولوژیکی ناشی از وارد کردن پادتن اورگانیزم های غیر گیاهی و خون گرم بررسی نشده است و ممکن است با وارد شدن آن ها در زنجیره غذایی و دام این خطرات به وجود آید.

تولید گیاهان تراژن مقاوم به ویروس از طریق انتقال ژن های مقاومت به ویروس (R-Genes) با راهبرد تغییر ژنوم گیاه

دربرهمکنش ژن برای ژن (gene to gene interaction) بین گیاه و پاتوژن ، ژن های غالب و نیمه غالب (R-Genes) در صورت داشتن ژن های نا پرآزار (avirulence genes, Avr) در پاتوژن سبب غیرسازگاری (incompatibility) می شوند. ژن های آر (R-Genes) اساس مکانیزم ایجاد مقاومت علیه قارچ ها ، باکتری ها ، نماتود ها و ویروس های گیاهی است. مقاومت موجود مونوژن های طبیعی ، برای کنترل بیماری های گیاهی ، اغلب در اصلاح نباتات مورد استفاده قرار می گیرد. برای اطلاع از دید کلی ساختار و فعالیت تولیدات ژن های- آر (R-Genes) که صفات مشترکی را نشان می دهند، به مقالات این منابع مراجعه شود (Hammond-Kosack & Jones, 1997 ; Richter & Ronald, 2000 ; Soosaar *et al.*, 2005).

از جمله از واکنش های مقاومت و پاسخ دفاعی ژن های-آر (R-Genes) پس از عفونت با عوامل بیماریزا، عبارتند از واکنش مقاومت بسیار بالا (**Extreme Resistance, ER**) و مقاومت فراحساسیت (**Hypersensitivity, Resistance HR**) هستند. واکنش مقاومت بسیار بالا (ER) در اولین سلول مورد حمله ویروس ظاهر می شود و بعلت عدم حمایت ژن های- آر از تکثیر ویروس، از انتشار آن جلوگیری می شود. مثلاً ژن های *Rx* سیب زمینی نشان می دهد که واکنش مقاومت بسیار بالا (ER) در مقابل ویروس ایکس سیب زمینی (*Potato virus X*) در پروتوپلاست وجود دارد (Bendahmane *et al.*, 1997, 1999, 2000). در این واکنش ویروس می تواند پروتوپلاست را آلوده کند اما قادر به آلوده کردن گیاه نیست و این وضعییت معمولاً به خاطر فقدان یا ناقص بودن پروتئین حرکتی ویروس است. مقاومت فراحساسیت (HR) مرگ سلول را در محل عفونت طرح ریزی می کند. مرگ سلول ها در محل عفونت به شکل آسیب موضعی (local lesion) باقی می ماند. تکثیر ویروس در این وضعیت محدود می شود به سلول های آسیب دیده موضعی و سلول های اطراف آن. بدین وسیله گیاه از یک عفونت سیستمیک ویروس مهاجم محفوظ می ماند.

از ژن های ایجاد کننده فراحساسیت (HR) ، ژن – ان (N-genes) معروف در توتون *Nicotiana glutinosa* در مقابل ویروس موزائیک توتون (*Tobacco mosaic virus, TMV*) است (Whitham *et al.*, 1994). تولیدات ژن های – آر گیاهی ، سبب شناسائی مستقیم یا غیر مستقیم و ناپرآزاری (avirulence) تولیدات ژنی ویروس می شوند. فقط از طریق سیگنال ترارسانی (transduction) ، در اثر مواد پیغام رسانی اولیه یا ثانوی (Messenger) که سبب تغییرات فیزیولوژیکی و فعالیت نسخه برداری می شوند ، واکنش مقاومت فراحساسیت و مرگ سلول ها فراهم می شود. اگر جدا کردن یک ژن – آر گیاهی ممکن می شد و ترادف آن تعیین می گردید ، با

منتقل کردن این ترادف به گیاه دیگر، در آن هم ایجاد مقاومت فرا حساسیت فراهم می‌شد. رسیدن باین هدف می‌تواند از طریق اصلاح نباتات سنتی یا تبدیل ژن در گیاهان امکان پذیر باشد. مثلا ژن *Rx1* اگر از سیب زمینی (*Solanum tuberosum*) ایزوله و به گیاهان توتون *Nicotiana benthamina* و *Nicotiana tabacum* منتقل شود، مقاومت فرا حساسیت در مقابل ویروس ایکس سیب زمینی (PVX) بوجود می‌آورد (Bendahmane et al., 1999).

ویتام و همکاران (Whitham et al., 1996) توانستند ژن های-ان (N-genes) از توتون *Nicotiana glutinosa* را به گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) منتقل کنند. این تحقیقات نشان می‌دهد که انتقال ژن های-ان در بین یک خانواده مثلا سولاناسه با موفقیت امکان پذیر است، برای این که سایر فاکتورهای سیگنال ترانسسانی (انتقال ژن فردی بفره دیگر) در گونه های یک خانواده موجود و فعال است. همینطور سایر ژن های-ان مؤثر علیه قارچ ها و باکتری ها مانند *Cf-9* و ژن *Pto*، از گوجه فرنگی *Lycopersicon esculentum*، سبب مقاومت در مقابل *Cladosporium fulvum* (در مورد ژن *Cf-9* به مقاله Stahl, Schmidt & Nehls در این کتاب مراجعه شود) و ژن (*Pto*) علیه باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* مقاومت ایجاد می‌کند، و این واکنش بعد از انتقال ژن های-ان در سایر گونه های جنس خانواده مذکور هم همان گونه عمل می‌کند، مانند ژن *Pto* در انواع توتون (*Nicotiana spp.*) (Thilmony et al., 1995) و ژن *Cf-9* در سیب زمینی و توتون (Hammond-Kosack et al., 1998). مثال های بالا نشان می‌دهد که با انتقال موفقیت آمیز ژن های-ان در داخل یک خانواده، امکان های خوبی در ایجاد مقاومت مستقیم بعد از انتقال به گیاهان، در مقایسه با اصلاح نباتات سنتی فراهم می‌کند. البته نباید به این فناوری عمومیت داد و تصور کرد که انتقال ژن برای ایجاد مقاومت در بین دو نوع مختلف گیاه همیشه امکان پذیر است. چون این خطر وجود دارد که بعد از ایزوله کردن و شناسائی ژن های-ان و انتقال آن به اورگانیزم نهائی، به علت فقدان سایر فاکتورها، مقاومت مورد نظر ایجاد نشود.

سایر راهبرد های ممکن

بوجود آمدن مقاومت در گیاهان تراژن، از طریق ریرختن سایر ژن ها هم امکان پذیر است. از جمله این ژن ها پروتئین غیرفعال کننده ریبوزم ها است (Tumer et al., 1999) و آنزیم های ویژه ریبونوکلیک اسید دو لا (dsRNA) می‌باشد (Watanabe et al., 1995). درباره جزئیات مکانیزم

این امکانات وارد بحث نمی شویم، برای این که هیچ کدام از این فنآوری ها تاکنون مزایای قابل مقایسه با RNA-silencing عرضه نکرده اند و راهبرد های مذکور به نتایج رضایت بخشی هم نرسیده اند.

مزایا و معایب فنآوری ژنتیکی ایجاد مقاومت علیه ویروس و مقایسه آن با روش اصلاح نباتات سنتی

در این قسمت، راهبرد های تهیه مقاومت در گیاهان تراژن، با مقاومت طبیعی منوژن ها و پلی ژن ها که با اصلاح نباتات سنتی قابل استفاده می شوند، مقایسه می گردد. مقایسه بین این دو فنآوری بیشتر محدود خواهد شد به طول زمان کاری، مفید بودن مقاومت، دوام مقاومت و گسترش دامنه تأثیر مقاومت. جنبه های ایمنی بیولوژیکی هم بطور خلاصه مد نظر گرفته خواهد شد و محدود به تراژن ها خواهد شد. جنبه های ایمنی ژن های نشانگر (Marker genes)، ارزشیابی تبارشناسی و یا مقبولیت گیاهان تراژن در نزد مردم، هم از بحث ما خارج است.

شرط اساسی استفاده از مقاومت مشتق شده از اسید ریبونوکلئیک (RmVR) RNA mediated virus resistance امکان انتقال قابل قبول آن به گیاهان است. مزیت ایجاد مقاومت علیه ویروس ها در گیاهان تراژن، راهبرد نسبتا ساده ای در مقایسه با اصلاح نباتات سنتی است. برای این که بتوان مقاومت طبیعی در گیاهان وحشی را با اصلاح نباتات به گیاهان زراعی منتقل کرد، بایستی محدودیت های تلقیح را بر طرف کرده با چندین بارتلقیح های برگشتی صفات دلخواه در ژن ها را تثبیت و هیبرید های بدست آمده را برای زمان بیشتری قابل استفاده کرد. در ایجاد مقاومت در تراژن ها می توان صفات مورد دلخواه را مستقیما وارد ارقام مورد نظر کرد. اگر مقاومت های طبیعی پلی ژن باشند و ژن اصلی و فرعی آن ها (major genes & minor genes) روشن نیست بایستی با استفاده از ژن های نشانگر، با آزمایش های زیستی یا بیوتست، و سلکسیون بیشتر فاکتور های انفرادی را حفظ کرد و از این طریق مقاومت پلی ژن را افزایش داد.

تهیه مقاومت از راه تراژن به قسمتی از کرموزم مربوط می شود که با یک مرتبه انتقال به گیاه، می توان در اصلاح نباتات سنتی هم این ژنگاه را با سلکسیون حفظ کرد. البته معلوم نیست که مقاومت ایجاد شده با روش RNA-silencing هم، در اصلاح نباتات سنتی با عمل تلقیح و سلکسیون به نسل های بعدی منتقل می شود. لذا پس از تلقیح و سلکسیون با روش سنتی، بهتر است صفت مقاومت را با بیوتست آزمایش و کنترل نمود. متد ساده و سریع تهیه مقاومت با مهندسی ژنتیک RNA-silencing که با انتقال ژن در گیاه صورت گرفته در مورد سایر روش ها مانند ژن های- آر (R-genes) و انتقال ژن های پادتن ویژه ویروس (virus specific antibody) هم صدق می کند.

عیب بزرگ روش RmVR در اختصاصیت یا مؤثر نبودن آن در مقابل گونه های دیگر ویروس که باهم دارای اختلاف ترادف اسید نوکلئیک در بیش از 10% هستند. اگر این ویژه گی را با ژن مقاوم طبیعی (R-genes) مقایسه کنیم معلوم می شود که در بیشتر موارد جدایه های مقاوم منوژن خیلی کم باهم اختلاف دارند و حتی ممکن است این اختلاف فقط مربوط به یک یا کمتر از یک اسید آمینه ناشی از تولیدات ژن کم آزار (avirulent genes production) باشد و سبب از بین رفتن مقاومت شود ، برای این که تولیدات ژن کم آزار خود فاکتور بیماری زائی می شوند.

مثال در این مورد می توان رپلیکاز ویروس موزائیک توتون وژن *N* (Padgett et al., 1997) ، پروتئین انتقال دهنده ویروس موزائیک گوجه فرنگی *Tomato mosaic virus* (ToMV) وژن *Tm-2²* (Weber et al., 1993) و پروتئین پوششی ویروس ایکس سیب زمینی *Potato viurs* *X* (PVX) وژن *Nx* (Santa Cruz & Baulcome, 1993) را نام برد.

ویروس های گیاهی یک جمعیت پویائی را تشکیل می دهند که در اثر تعدد تکثیر ، خود را با شرایط تغییر یافته محیط زیست وفق داده و منطبق می کنند (Roossinck, 1997 ; Holland & Domingo, 2003 ; Garcia-Arenal et al., 1998). اگر یک منوژن مقاوم طبیعی در اثر تهیه جدایه توسط « تولیدات ژنی کم آزار » از بین می رود ، بستگی به چگونگی موتاسیون یا استحاله ویروس دارد ، که چه چیزی را از دست داده است. این شرایط در مورد مقاومت بدست آمده در تراژن ، مانند انتقال ژن های -آر R-genes یا انتقال ژن پادتن ویژه بدست آمده هم صدق می کند.

با چه سرعتی در اثر کاشت گیاهان تراژن که ترادف RmVR متغییر دارند و با سللکتیو، امکان حذف پاتوژن هائی که از این مقاومت عبور می کنند ، وجود داشته باشد، آزمایش نشده است و نمی توان نتیجه آن را هم پیش گوئی کرد.

اطلاعات موجود ناشی از وسعت دامنه با سللکسیون ژن هائی که مقاومت را می شکنند حاکی از وجود تعداد زیادی ژن شکننده مقاومت است. اگر در عمل نشان داده شود که تغییرات ویژه ترادف 10% ثابت باقی می ماند (Prins, 2003) در آن صورت مقاومت ایجاد شده بر اساس RNA-silencing در مقایسه با مقاومت طبیعی ، با دوام تر است. معلوم نیست در جمعیت ویروس های گیاهی کدام یکی از آن ها با مقاومت RNA-silencing جلوگیری می شود و اگر موتاسیونی در آن ها به وجود آید دارای پروتئین کاهش دهنده مقاومت باشد و به تواند مجددا عفونت ایجاد کند. پروتئین های سرکوبگر (suppressor protein) مقاومت ناشی از RNA-silencing را می شکنند. این مشکل با تهیه گیاهان تراژن که به خیلی از ویروس ها مقاوم باشد برطرف می شود.

چشم انداز و ارزشیابی کلی

بدون شک ، با روش های ذکر شده تکنولوژی زیستی تسهیلاتی در مبارزه با بیماری های ویروسی نسبت به روش های سنتی ، فراهم کرده است.

اگر خطرات زیستی ممکن راهبرد های شرح داده شده ، در گیاهان تراژن مقاوم به ویروس ها را مورد توجه قرار دهیم ، تکنولوژی های مقاومت تهیه شده با پروتئین پوششی ویروس و مقاومت مشتق شده از پروتئین ویروس (coat protein-mediated resistance) در مقایسه با مقاومت ناشی از خاموشی آر.ان.ای (RNA-silencing) بعلاوه بروز صفات ارثی پروتئین های ویروسی معایب بیشتری همراه دارد تا مزایای ناشی از این مقاومت ها ، لذا استفاده از آنها شاید در آینده کاربردی نداشته باشد.

استفاده از پادتن های ویژه ویروس یک کارکرد ظریفی است ، اما شاید به خاطر نگرانی های ایمنی غذایی از آن استفاده نه خواهد شد. برعکس استفاده از ژن های - آر (R-genes) ، آینده خوبی را پیش رو دارد. هیچ گونه خطرات زیستی برای این فناوری پیش بینی نمی شود چون تولید مقاومت یک منبع طبیعی دارد ، اما بخاطر صرف وقت زیاد برای شناسایی و ایزوله کردن ژن های - آر خیلی مورد استقبال قرار نگرفته است.

انتقال توالی ویروسی که قبلا با مکانیزم مقاومت علیه ویروس خود گیاه (RNA-silencing) بوجود آمده است ، عالی ترین فناوری ایجاد مقاومت تاکنون است. این فناوری کمترین خطر را دارد و شاید فاقد هرگونه خطرات زیستی است برای اینکه در این فناوری هیچ گونه پروتئین ویروس وارد گیاه نمی شود ، بلکه قطعه کوچکی از ژن وارد می شود. در این صورت از نظرتئوری امکان بوجود آمدن نوترکیبی با ویروس های پرآزار وجود ندارد. از نظر دوام و داشتن مقاومت دائم ، بطور کلی ویروس ها از پاتوژن های هستند که خود را سریع به تغییرات وفق می دهند و بسرعت تکثیر می شوند بدون اینکه فرصت اصلاح اشتباهات امکان پذیر باشد. از طرف دیگر تغییرات ژنتیکی و وراثتی ویروس را برخلاف پاتوژن های دیگر گیاهی بر راحتی می شود از بین جمعیت گونه های ویروس تشخیص و دنبال کرد. در پایان فناوری RmVR (RNA mediated virus resistance) یکی دیگر از راهبرد های است که در آینده با انعطاف پذیری بیشتر ایجاد مقاومت را با اصلاح نباتات سنتی فراهم می کند.

Literatur

- Aaziz R, Tepfer M., 1999: Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. *J Gen Virol* **80**, 1339-46.
- Agrios, G.N., 1998: *Plant Pathology*. 3th ed. Academic Press, San Diego.
- Baulcombe, D., 2004: RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-363.

- Baulcombe, D., 2005: RNA silencing. *Trends Biochem. Sci.* 30, 290-293.
- Baulcombe, D.C., 1994: Replicase mediated resistance: A novel type of virus resistance in transgenic plants. *Trends in Microbiology* 2, 60-63.
- Bejarano, ESCHERICHIA, & Lichtenstein, C.P., 1994: Expression of TGMV antisense RNA in transgenic tobacco inhibits replication of BCTV but not ACMV geminiviruses. *Plant Mol Biol* 24, 241-248.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K. & Baulcombe, D. C. 1999: The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11, 781-791.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K.V., and Baulcombe, D.C. 1997: High resolution and physical mapping of the *Rx* gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato. *Theor Appl Genet* 95, 153-162.
- Bendahmane, A., Querci, M., Kanyuka, K. & Baulcombe, D.C., 2000 : Agrobacterium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *Plant J* 21, 73-81.
- Bendahmane, M., & Gronenborn, B., 1997: Engineering resistance against *tomato yellow leaf curl virus* (TYLCU) using antisense RNA. *Plant Mol Biol* 33, 351-357.
- Bendahmane, M., Fitchen, J.H., Zhang, G., & Beachy, R.N., 1997: Studies of Coat Protein-Mediated Resistance to tobacco mosaic tobamovirus: Correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance. *Escherichia J Virol* 71, 7942-7950.
- Bianchardi, ESCHERICHIA, Lewellen, R.T., Biaggi, M., Erichsen, A.W. & Stevanato, P., 2002: The origin of rhizomania resistance in sugar beet. *Euphytica*, 127, 383-397.
- Boonrod, K., Galetzka, D., Nagy, P.D., Conrad, U., & Krczal, G., 2004: Single-chain antibodies against a plant viral RNA-dependent RNA polymerase confer virus resistance. *Escherichia Nat Biotechnol* 22, 856-862.
- Bowers, J.H., Bailey, B.A., Hebbar, P.K., Sanogo, S., & Lumsden, R.D. 2001: The impact of plant diseases on world chocolate production. *Online Escherichia Plant Health Progress* DOI:10.1094/PHP-2001-0709-01-RV.
- Brommonschenkel, S.H., & Tanksley, S.D. (1997): Map-based cloning of the tomato genomic region that spans the Sw-5 tospovirus resistance gene in tomato. *Mol Gen Genet* 256, 121-126.
- Brunetti, A., Tavazza, R., Noris, ESCHERICHIA, Lucioli, A., Accotto, G.P., & Tavazza, M., 2001: Transgenically expressed T-Rep of *tomato yellow leaf curl Sardinia virus* acts as a trans-dominant-negative mutant, inhibiting viral transcription and replication. *J Virol* 75, 10573-10581.
- Chen, Y.K., Lohuis, H., Goldbach, R., & Prins, M., 2004: High frequency induction of RNA-mediated resistance against Cucumber mosaic virus using inverted repeat constructs. *Molecular Breeding* 14, 215-226.
- Cooper, B., Schmitz, I., Rao, A.L.N., Beachy, R.N. & Dodds, J.A., 1996: Cell to cell transport of movement defective cucumber mosaic and tobacco mosaic virus in transgenic plants expressing heterologous movement proteins. *Virology* 216, 208-213.
- Costa, A.S., & Müller, G.W., 1980: Tristeza control by cross protection a U.S. Brazil cooperative success. *Plant Disease* 64, 538-541.
- Covey, S.N., Al-Kaff, N.S., Langara, A., & Turner, D.S. 1997: Plants combat infection by gene silencing. *Nature* 385, 781-782.
- Day, A.G., Bejarano, ESCHERICHIA, Buck, K.W., Burrell, M., & Lichtenstein, C.P., 1991: Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance

- to the DNA virus *tomato golden mosaic virus*. Proc Natl Acad Sci USA 88, 6721-6725.
- Ding, S.W., Li, H., Lu, R., Li, F., & Li, W.X., 2004: RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. Virus Res 102, 109-115.
- Dougherty, W.G., Lindbo, J.A., Smith, H.A., Parks, T.D., Swaney, S., & Proebsting, W.M., 1994: RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. Mol Plant-Microbe Interact 7, 544-552.
- Duan, Y.P., Powell, C.A., Webb, S.ESCHERICHIA, Purcifull, D.ESCHERICHIA, & Hiebert, ESCHERICHIA, 1997: Geminivirus resistance in transgenic tobacco expressing mutated BC1 protein. Mol Plant Microbe Interact 10, 617-623.
- Dudley, N.R., & Goldstein, B., 2003: RNA interference: silencing in the cytoplasm and nucleus. Curr Opin Mol Ther 5, 113-117.
- Dunoyer, P., & Voinnet, O. 2005: The complex interplay between plant viruses and host RNA-silencing pathways. Current Opinion in Plant Biology 8, 415-423.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., & Tuschl, T., 2001: RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev 15, 188-200.
- Elmayan, T., & Vaucheret, H., 1996: Single copies of a 35S-driven transgene can undergo post-transcriptional silencing at each generation or can be transcriptionally inactivated in trans by a 35S silencer. Plant J 9, 787-797.
- English, J. J. Mueller, ESCHERICHIA, & Baulcombe, D.C., 1996: Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. Plant Cell 8, 179-188.
- Fecker, L.F., Koenig, R., & Obermeier, C., 1997: *Nicotiana benthamiana* plants expressing beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) coat protein-specific scFv are partially protected against the establishment of the virus in the early stages of infection and its pathogenic effects in the late stages of infection. Arch Virol 142, 1857-1863.
- Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F. A., & Pillai, R.S., 2005: Posttranscriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. Curr. Opin. Struct.Biol. 15, 331-341.
- Fitch, J.H., and Beachy, R.N., 1993: Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. Annu Rev Microbiol 47, 739-763.
- Garcia-Arenal, F., Fraile, A., & Malpica, J.M., 2003: Variation and evolution of plant virus populations. Int Microbiol 6, 225-232.
- Gargouri-Bouazid, R., Jaoua, L., Rouis, S., Saidi, M.N., Bouaziz, D., & Ellouz, R., 2006: PVY-Resistant Transgenic Potato Plants Expressing an Anti-NIa Protein scFv Antibody. Mol Biotechnol 33, 133-140.
- Hackland, A. F., Rybicki, ESCHERICHIA P. and Thomson, J. A., 1994: Coat protein-mediated resistance in transgenic plants. Arch Virol 139, 1-22.
- Haddidi, A., Khertarpal, R.K., and Koganezawa, H. (eds.). 1998: Plant Virus Disease Control. APS Press, St. Paul, MN.
- Hamilton, A.J., & Baulcombe, D.C., 1999: A novel species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing. Science 286, 950-952.
- Hamilton, A.J., Voinnet, O., Chappell, L., & Baulcombe, D.C., 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. EMBO J 21, 4671-4679.
- Hammond, S.M., Bernstein, ESCHERICHIA, Beach, D., & Hannon G.J., 2000: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells.

- Nature **404**, 293-296.
- Hammond-Kosack, K. ESCHERICHIA, Tang, S., Harrison, K., & Jones, J. D. G. 1998: The tomato Cf-9 disease resistance gene functions in tobacco and potato to confer responsiveness to the fungal avirulence gene product *Avr9*. *Plant Cell* **10**, 1251-1266.
- Hammond-Kosack, K.ESCHERICHIA, and Jones, J.D.G., 1997: Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* **48**, 575-607.
- Helliwell, C.A., & Waterhouse, P.M., 2005: Constructs and methods for hairpin RNA-mediated gene silencing in plants. *Methods Enzymol* **392**, 24-35.
- Hemenway, C., Fang, R.X., Kaniewski, W., Chua, N.H., & Tumer, N.ESCHERICHIA, 1988: Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the *potato virus X* coat protein or its antisense RNA. *EMBO J* **7**, 1273-1280.
- Holland, J.J., & Domingo, ESCHERICHIA, 1998: Origin and evolution of viruses. *Virus Genes* **16**, 13-21.
- Hong, Y., Saunders, K., Hartley, M.R., & Stanley, J., 1996: Virus resistance in *Nicotiana benthamiana* conferred by *African cassava mosaic virus* replication-associated protein (AC1) transgenEscherichia *Virology* **220**, 119-127.
- Hull, R. & Davies, J.W. 1992: Approaches to nonconventional control of plant virus diseases. *Crit Rev Plant Sci* **11**, 17-33.
- Hull, R. 2002: *Matthew's Plant Virology*. 4th Edition. Academic Press, San Diego, CA.
- Jakab, G., Vaistij, F.ESCHERICHIA, Droz, ESCHERICHIA & Malnoe, P., 1997: Transgenic plants expressing viral sequences create a favourable environment for recombination between viral sequences. In: Balacz, ESCHERICHIA and Tepfer, M., (Editors), *Virus resistant transgenic plants: potential ecological impact*. pp. 45-50: Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Jan, F. J. Fagoaga, C. Pang, S. Z., & Gonsalves, D., 2000a: A minimum length of N gene sequence in transgenic plants is required for RNA-mediated tospovirus resistancEscherichia *J Gen Virol* **81**, 235-242.
- Jan, F. J. Fagoaga, C. Pang, S. Z., & Gonsalves, D., 2000b: A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homologydependent gene silencing. *J Gen Virol* **81**, 2103-2109.
- Lapidot, M., Gafney, R., Ding, B., Wolf, S., Lucas, W.J. & Beachy, R.N., 1993: A dysfunctional movement protein of Tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant Journal* **4**, 959-970.
- Li, W.X., & Ding, S.W., 2001: Viral suppressors of RNA silencing. *Curr Opin Biotechnol* **12**, 150-154.
- Lindbo, J.A., & Dougherty, W.G., 1992: Untranslatable transcripts of the Tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with Tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* **189**, 725-733.
- Lindbo, J.A., & Dougherty, W.G., 2005: *Plant Pathology and RNAi: A Brief History*. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 1-7.
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M., & Dougherty, W.G. 1993: Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistancEscherichia *Plant Cell* **5**, 1749-1759.
- Loebenstein, G., 1962: Inducing partial protection in the host plant with native virus protein. *Virology* **17**, 574-581.

- Loesch Fries, L.S., Merlo, D., Zinnen, T., Burhop, L. & Hill, K., 1987: Expression of Alfalfa mosaic virus RNA 4 in transgenic plants confers virus resistance. *Escherichia EMBO Journal* 6, 1845-1851.
- Lomonosoff, G. P. 1995: Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 33, 323-343.
- McKinney, H.H., 1929: Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *Journal of Agricultural Research* 39, 557-578.
- Mitter, N., Sulistyowati, ESCHERICHIA, & Dietzgen, R.G., 2003: Cucumber mosaic virus infection transiently breaks dsRNA-induced transgenic immunity to *Potato virus Y* in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* 16, 936-944.
- Mitter, N., Sulistyowati, ESCHERICHIA, Graham, M. W., & Dietzgen, R.G., 2001: Suppression of gene silencing: A threat to virus-resistant transgenic plants? *Trends Plant Sci* 6, 246-247.
- Moissiard, G., & Voinnet, O., 2004: Viral suppression of RNA silencing in plants. *Mol Plant Pathol* 5, 71-82.
- Morozov, S.Y., Fedorkin, O.N., Juttner, G., Schiemann, J., Baulcombe, D.C. & Atabekov, J.G., 1997. Complementation of a Potato virus X mutant mediated by bombardment of plant tissues with cloned viral movement protein genes. *Journal of General Virology* 78, 2077-2083.
- Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen, R. 1990: Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289.
- Nelson, R. S., P. Powell-Abel, and R. N. Beachy. 1987: Lesions and virus accumulation in inoculated transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of tobacco mosaic virus. *Virology* 158, 126-132.
- Noris, ESCHERICHIA, Accotto, G.P., Tavazza, R., Brunetti, A., Crespi, S., & Tavazza, M., 1996: Resistance to tomato yellow leaf curl geminivirus in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with a truncated viral C1 gene. *Escherichia Virology* 224, 130-138.
- Padgett, H.S., Watanabe, Y., & Beachy, R.N., 1997: Identification of the TMV Replicase Sequence That Activates the N Gene-Mediated Hypersensitive Response. *Escherichia MPMI* 10, 709-715.
- Palauqui, J.-C., Elmayan, T., Pollien, J.-M., & Vaucheret, H., 1997: Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* 16, 4738-4745.
- Palukaitis, P., & Zaitlin, M. 1997: Replicase-mediated resistance to plant virus disease. *Escherichia Adv. Virus Res* 48, 349-377.
- Pang, S.Z., Jan, F.J., & Gonsalves, D., 1997: Nontarget DNA sequences reduce the transgene length necessary for RNA-mediated tospovirus resistance in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 8261-8266.
- Powell, P.A., Nelson, R.S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T. & Beachy, R.N., 1986: Delay of disease development in transgenic plants that express the Tobacco mosaic virus coat protein gene. *Escherichia Science* 232, 738-743.
- Powell, P.A., Sanders, P.R., Tumer, N., Fraley, R.T. & Beachy, R.N., 1990: Protection against Tobacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences. *Virology* 175, 124-130.

- Prins, M., & Goldbach, R., 1998: The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. *Trends Microbiol.* 6, 31-35.
- Prins, M., 2003: Broad virus resistance in transgenic plants *Trends in Biotechnology* 21, 373-375.
- Prins, M., de Haan, P., Luyten, R., van Veller, M., van Grinsven, M.Q., & Goldbach, R., 1995: Broad resistance to tospoviruses in transgenic tobacco plants expressing three tospoviral nucleoprotein gene sequence *Escherichia Mol. Plant Microbe Interact* 8, 85-91.
- Prins, M., Lohuis, D., Schots, A., & Goldbach, R., 2005: Phage display-selected single-chain antibodies confer high levels of resistance against Tomato spotted wilt virus. *J Gen Virol* 86, 2107-2113.
- Ratcliff, F., Harrison, B. D. & Baulcombe, D.C., 1999. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276, 1558-1560.
- Ratcliff, F., MacFarlane, S. and Baulcombe, D.C. 1999: Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross protection between viruses. *Plant Cell* 11, 1207-1215.
- Richard-Molard, M.S. & Cariolle, M., 2001: Stress hydrique et abiotique et amélioration génétique *Escherichia Proc. IIRB 64th Cong. Bruges, Belgium.* pp. 153–158.
- Richter, T. ESCHERICHIA, & Ronald, P.C., 2000: The evolution of disease resistance genes. *Plant Mol Biol* 42, 195-204.
- Roossinck, M.J., 1997: Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Review of Phytopathology* 35, 191-209.
- Sanford, J.C., & Johnston, S.A.. 1985: The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome *Escherichia J Theor Biol* 113, 395-405.
- Santa Cruz, S., & Baulcombe, D.C., 1993 : Molecular analysis of potato virus X isolates in relation to the potato hypersensitivity gene *Nx*. *MPMI* 6, 707-714.
- Savenkov, ESCHERICHIAI., & Valkonen, J.P.T., 2001: Coat protein gene-mediated resistance to *Potato virus A* in transgenic plants is suppressed following infection with another potyvirus. *J Gen. Virol* 82, 2275-2278.
- Schuchert, W., Rohde, W., and Peerenboom, ESCHERICHIA 1996: Die virusresistente Kartoffel. *MPIZ aktuell* 02, 1-4
- Silhavy, D., & Burgyan, J. 2004: Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends Plant Sci* 9, 76-83.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G., & Waterhouse, P.M., 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407, 319-20.
- Soosaar, J.L., Burch-Smith, T.M., & Dinesh-Kumar, S.P., 2005: Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nat Rev Microbiol* 3, 789-798.
- Susi, P., Hohkuri, M., Wahlroos, T., & Kilby, N.J. 2004: Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant Mol Biol* 54, 157-174.
- Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P., & Zamore, P.D., 2003: A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 17, 49-63.
- Tavladoraki, P., Benvenuto, ESCHERICHIA, Trinca, S., De Martinis, D., Cattaneo, A., & Galeffi, P., 1993. Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* 366, 469-472.
- Tepfer, M. & Balázs, ESCHERICHIA (editors), 1997: *Virus-Resistant Transgenic Plants : Potential ecological Impact.* Versailles & Heidelberg : INRA & Springer-Verlag.
- Tepfer, M., 2002: Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. *Annu Rev Phytopathol*

- 40, 467-491.
- Thilmony, R.L., Chen, S., Bressan, R.A., and Martin, G.B., 1995: Expression of the tomato *Pto* gene in tobacco enhances resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* expressing *AvrPto* Plant Cell 7, 1529-1537.
- Tumer, N.ESCHERICHIA, Hudak, K., Di, R., Coetzer, C., Wang, P., & Zoubenko, O., 1999: Pokeweed antiviral protein and its applications. Curr Top Microbiol 240, 139-158.
- Tumer, N.ESCHERICHIA, Kaniewski, W., Haley, L. Gehrke, L. Lodge, J.K., and Sanders, P., 1991: The second amino acid of alfalfa mosaic virus coat protein is critical for coat protein-mediated protection. Proc Natl Acad Sci USA 88, 2331-2335.
- van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N., & Stuitje, A.R., 1990: Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. Plant Cell 2, 291-299.
- Voinnet O. 2001: RNA silencing as a plant immune system against viruses. Trends Genet 17, 449-459.
- Voinnet, O. 2005: Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. Nat Rev Genet 6, 206-220.
- Voinnet, O., & Baulcombe, D.C., 1997: Systemic signalling in gene silencing. Nature 389, 553.
- Voinnet, O., Pinto, Y. M. & Baulcombe, D. C., 1999: Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. Proc Natl Acad Sci USA 96, 14147-14152.
- Wang, M.-B., & Waterhouse, P.M. 2000: High-efficiency silencing of a β -glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but independent of DNA methylation. Plant Mol Biol 43, 67-82.
- Watanabe, Y., Ogawa, T., & Takahashi, H., Ishida, I., Takeuchi, Y., Yamamoto, M., & Okada, Y., 1995: Resistance against multiple plant viruses in plants mediated by a double stranded-RNA specific Ribonuclease FEBS Lett 372, 165-168.
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W., & Wang, M.B., 1998: Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. Proc Natl Acad Sci USA 95, 13959-13964.
- Weber, H., Schultze, S., & Pfitzner, A.J.P., 1993: Amino acid substitutions in the tomato mosaic virus 30-kilodalton movement protein confers the ability to overcome the *Tm2²* resistance gene in tomato. J Virol 67, 6432-6438.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., & Waterhouse, P., 2001: Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. Plant J 27, 581-590.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., & Baker, B.J., 1994: The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: Similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. Cell 78, 1101-1115.
- Whitham, S., McCormick, S., & Baker, B., 1996: The *N* gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. Proc Natl Acad Sci USA 93, 8776-8781.
- Wu, X., Beachy, R.N., Wilson, T.M.A., and Shaw J.G., 1990: Inhibition of uncoating of tobacco mosaic particles in protoplasts from transgenic tobacco plants that express the viral coat protein gene Escherichia Virology 179, 893-895.

Yusibov, V., and Loesch-Fries, S. 1995: High-affinity RNA-binding domains of alfalfa mosaic virus coat protein are not required for coat protein-mediated resistance in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 8980–8984.

گیاهان تراژن مقاوم به حشرات دراروپای غربی : وضع و آینده آن ها

یوآخیم موسر

Joachim Moeser

Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung Agrarentomologie, Georg-August-Universität, Grisebachstr. 6, 37077 Göttingen

پیشگفتار

از گیاهان زراعی، که دراروپای غربی کاشته می شوند، ذرت، سیب زمینی و منداب گیاهانی هستند که در حال حاضر در آن ها مقاومت علیه حشرات با فنآوری گیاهان تراژن مقاوم به حشرات تهیه شده است و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه می باشند. با توجه به مراتب بالا و اطلاعاتی که امروزه در دسترس است، نظری به آینده این فنآوری انداخته می شود. انگیزه این بررسی، چگونگی مقاومت گیاهان مذکور علیه حشرات می باشد. ارزشیابی ایمنی این گیاهان، بدلیل کمبود جا مورد بحث و بررسی قرار نمی گیرد.

ذرت بی - تی (Bt) و تاریخچه بسترسازی

در حال حاضر، کشت گیاهان تراژن مقاوم به حشرات از یک رشد کمی دراروپا برخوردار است. تنها گیاه تراژن مقاوم به حشرات که در حد قابل قبولی کاشته می شود، ذرت بی - تی است. دونوع روش MON 810، Bt 178 برای ایجاد مقاومت در این دو ذرت به کار رفته است. این راهبرد ها در ارقام مختلف ذرت و در کشورهای متفاوت در دسترس می باشد. نمونه بی - تی یازده (Bt 11)، دارای مجوز بهداشتی برای تغذیه انسان و خوراک دام است. هر سه نوع ذرت، زهرابه یا توکسین کریستال (Cry 1 Ab) مخصوص پروانه ها را تولید می کنند. زهرابه کریستالی (=Cry) توسط باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt) از مرحله رشدی به مرحله تولید اسپر ایجاد می شود (Sharma et al. 2000). تمام زهرابه های مورد استفاده بی - تی در این مرحله از جدایه های باسیلوس تورینزینزیز واریته کورستاکی *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* منشأ می گیرند. زیرا جدایه های باسیلوس تورینزینزیز واریته کورستاکی، در مقایسه با سایر جدایه ها، بیشترین زهرابه را

تولید می کنند. در اوایل سال 1980، از اولین اقدام به انتقال و همسانه سازی زهرابه بی - تی در باکتری *Escherichia coli* (Schnepf & Whitley, 1981) تا تولید تراژن قابل عرضه در بازارهای آمریکا در سال 1990، در حدود 10 سال به طول انجامید. بعد از سال 1996 سطح زیرکشت ذرت های تراژن در آمریکا افزایش قابل ملاحظه ای پیدا کرد (McLaren, 1998).

در ابتدا ژن های تولید کننده توکسین را به پنج گروه دسته از نظر خصوصیات حشره و توالی های خودی (sequence homologue) تقسیم شدند (Hoftey & Whiteley, 1989)

- 1 ژن هائی که زهرابه کریستالی (Typ I Cry-Genes) مخصوص پروانه ها (Lepidoptera) و پروتئین 130 کیلودالتون را کد می کنند.
- 2 ژن هائی که زهرابه کریستالی (Typ II Cry-Genes) مخصوص پروانه ها (Lepidoptera) و مگس ها (Diptera) و پروتئین 70 کیلودالتون را کد می کنند.
- 3 ژن هائی که زهرابه کریستالی (Typ III Cry-Genes) مخصوص سوسک ها (Coleoptera) و همچنین پروتئین 70 کیلودالتون را کد می کنند.
- 4 ژن هائی که زهرابه کریستالی (Typ IV Cry-Genes) مخصوص مگس ها (Diptera) را دارند.
- 5 ژن هائی که زهرابه کریستالی (Typ V Cry-Genes) و پروتئین هائی را کد می کنند که مخصوص پروانه ها و سوسک ها می باشند (Tailor *et al.*, 1992).

اکنون معلوم شده است که توکسین (Bt- δ - Endotoxine) از 140 ژن تشکیل شده است که ویژگی های پروانه ها، سوسک ها و مگس ها را دارا می باشد (Crickmore *et al.*, 1998).

نحوه اثرگذاری (mechanism of action)

غیرفعال شدن کریستال های پروتئین (= Protoxine) در روده، درجائی که اندوتوکسین گاما - δ Endotoxine بوجود می آید، با کمک آنزیم پروتئیناز (Protease) در درجه اسیدی بالا صورت می گیرد. زهرابه فوق، از ترکیبات انتهای آمینی (N-terminal) N پروتوکسین (Protoxins) بوجود می آید، ولی قسمتی از آن توسط انتهای کربنی (C-terminal) C هیدرولیز می شود (Choma *et al.*, 1990). توکسین فعال شده توسط پذیرنده های ویژه به غشاء وزیکول BBMV یا ریزکیسه های (brush border membrane vesicles) سطح روده میانی (Epithels) می چسبد. در روده در اثر اتصال توکسین به غشاء، سبب تولید زخم موضعی می شود. یک رابطه مثبت بین فعالیت

توکسین و توانایی پذیرنده غشاء ریزکیسه (BBMV) وجود دارد (Grill *et al.*, 1992). درجه و اثرسمیت هم رابطه مثبتی با تعداد پذیرنده ها (receptors) و گرایش پذیرش آن ها دارد (Van Rie *et al.*, 1989). سمیت در تشکیلات ناحیه (α - Helices) سبب می شود. زهرابه، پس از اتصال به سلول های قسمت میانی روده (Epithels) می توانند تشکیلات ناحیه (α - Helices) و غشاء (apical) آن را سوراخ و کانال هائی برای عبوریون (Ions) درست نمایند. کانال ها به صورت انتخابی یا پتاسیم (K^+) عبور می دهند یا به صورت غیر انتخابی قابل عبور برای سایرکاتیون ها می باشند. عبور آنیون ها بستگی به اسیدیته (pH) آن ها دارد (Schwartz *et al.*, 1993). حضور توکسین کریستال (Cry 1 Ac) در روده سبب تغییر عبورپذیری (permiability) غشاء آن می شود (Carroll & Ellar, 1993). مشاهده شده است که در اثرشستشو و خارج شدن پتاسیم از سلول های روده، دیواره سلول های آن متورم می شوند و در اثر اختلاف اوسمزی (osmosis)، سلول های روده حل و از بین می روند (Knowels & Dow, 1993).

ارقام جدید بی - تی در آلمان

تاکنون 5 رقم ذرت در آلمان مجوز کاشت گرفته اند و همه آن ها با روش MON 810 به دست آمده اند. این ارقام با انگیزه مقاومت در مقابل کرم ساقه خوار ذرت *Ostrinia nubilalis* Hübner تهیه شده اند. در اوایل دهه 1990، پس از ورود سوسک ریشه ذرت (*Diabrotica virgifera virgifera*) به اروپا دونوع ذرت جدید هم با عملکرد بی - تی : MON 863 و MON 88017 تهیه شدند. این ارقام در آینده اهمیت بیشتری نسبت به ارقامی که امروزه علیه کرم ساقه خوار ذرت استفاده می شوند، خواهند داشت. ذرت بی - تی MON 863 برای مصرف غذائی و خوراک دام مجوز فروش و کشت گرفته است (این نمونه به نام Yieldgard® rootworm از تولیدات شرکت Monsanto در آمریکا است) و صدور مجوز کشت آن در اروپا در دست اقدام است. در حال حاضر در آلمان، پروژه ای در وزارت فدرال برای آموزش و تحقیق (BMBF) جهت بررسی ایمنی این رقم، در دست اجرا است. این پروژه زهرابه (Cry 3Bb) را (Toxin) برای مقابله با سوسک ریشه ذرت (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) در رقم MON 88017 بررسی می کند که همانند رقم MON 863 می باشد اما فاقد نشان گر آنتی بیوتیک (antibiotics-marker) برای سللکسیون است. این نمونه دارای نشان گر مقاوم به علف کش گلیفوسات (Glyphosat resistance - marker) می باشد. ژن انتقال داده شده به این رقم، یک ژن ساخته شده از ژن وحشی Cry 3Bb1 در باکتری *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* است که دارای 8 برابر قدرت حشره کشی بیشتر نسبت به نوع وحشی آن ژن

می باشد. کدن بهینه شده (کدن : رمزخاتمه زنجیره پروتئینی - مترجم) آن برای بروز صفات ارثی در گیاهان مونوکوتیلدون به گونه ای تنظیم شده است که می بایستی با پیشبر (4AS1 - Promoters) در ریشه عمل نماید (Vaughn *et al.*, 2005) « پیشبر، ناحیه ای از دی. ان. ا. (DNA) است که پلیمراز آر. ان. ا. (RNA) به آن می چسبد و این آنزیم را به نقطه شروع نسخه برداری راهنمایی می کند. نقل از فرهنگ کشاورزی، جلد دوم، انتشارات دانشگاه تهران » . در حال حاضر در آمریکا، یک رقم دیگری از ذرت به نام (Herculex rootworm® , Dow Agrosience/Pioneer) که مقاوم به سوسک ریشه ذرت می باشد، در حال بررسی برای صدور مجوز کشت می باشد. این ذرت توکسین های (Cry 34, Cry 35) را ایجاد می کند که سمیت مشترک این دو توکسین به مراتب بیشتر از سمیت توکسین های کریستالی هریک به صورت منفرد است. پیش بینی می شود این رقم ذرت در دو سال آینده در اروپا هم مجوز کشت دریافت کند.

در حال حاضر، هیبرید هائی در دست توسعه است که هم مقاوم به کرم ساقه خوار ذرت *Ostrinia nubilalis* و هم مقاوم به سوسک ریشه (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) می باشد که (Stacking) نامیده می شود. در آینده هیبریدی مورد انتظار است که دارای 3 صفت تراژنی خواهد بود . یعنی در کنار مقاومت به حشرات، مقاوم به علف کش ها نیز می باشد.

ایجاد مقاومت در ارگانیزم ها (حشرات)

در طرح ریزی و استفاده از گیاهان زارعی تراژن، ایجاد و توسعه مقاومت در خود حشرات هم همیشه مد نظر محققین بوده است. اما مشکل همیشه این بوده و است که حشرات مقاوم شده به سرعت به زهرا به های ایجاد شده عادت کرده و مواد بی - تی را خنثی می کنند و حشره کش ها در کشت های زیستی نتایج ندارد.

تئوری های زیادی در این مورد وجود دارد که چگونه این مقاومت به وجود می آید مانند:

- از بین رفتن پروتئاز در روده که برای فعال کردن پروتوکسین لازم است (Ferre & Van Rie, 2002)

- فعالیت زیاد proteolysis که سبب تجزیه توکسین در روده می شود

- کاهش توانائی اتصال به غشأ سلول های اپی تل (Epithel) روده (Avisar *et al.*, 2004)

تاکنون هیچ جمعیت حشره ای مقاوم در مزرعه روی گیاهان زراعی تراژن پیدا نشده است. علت آن شاید مربوط به انجام آزمایش در مزارع گیاهان غیر تراژن باشد. گیاهان غیر تراژن می بایستی به

تقویت از دید حشرات کمک کند تا اگر مقاومتی در حشرات به وجود می آید تعداد آن ها را کمتر کند. این مقاومت ممکن است از نوترکیبی و هموزیگوت (homozygot) مقاوم نسل اول (F1) به وجود آید. تاکنون سه نوع حشره مختلف در مجموع با هفت نمونه برداری متفاوت آفات مانند *Plutella xylostella* L. و *Pectinophora gossypiella* Sauter و *Helicoverpa armigera* Hübner در آزمایشگاه پرورش یافته اند که می توانند بر روی گیاهان تراژن دارای بی - تی زندگی و توسعه پیدا کنند (Tabashnik et al., 2003).

تعداد بسیاری از حشرات به دست آمده در آزمایشگاه، با وجود بودن توکسین به مقدار 70 تا 10000 مرتبه در غذای مصنوعی و نشان دادن مقاومت حشرات در آن ها، نتوانستند در گیاهان محتوی بی - تی در مزرعه مقاومت نشان دهند و توسعه پیدا کنند و این تجربه، پیچیدگی طرح تهیه مقاومت حشرات گیاهان تراژن را روشن تر می کند. آمار برداری فشرده از یک جمعیت حشره در مزرعه، افزایشی در تکرار مقاومت عمومی را نشان نداد. دلیل عدم وجود مقاومت به فراوانی کم حشره، صفت ارثی ضعیف و مغلوب، بدی امکان تغذیه حشرات از گیاهان مقاوم در مقابل گیاهان غیرمقاوم فاقد بی - تی می باشد (Tabashnik et al., 2003).

امکانات دیگر گیاهان تراژن مقاوم به حشرات

در کنار انتقال سنتی ژن های بی - تی، در پانزده سال گذشته امکانات دیگری هم برای تهیه گیاهان مقاوم به حشرات مورد بررسی قرار گرفته است که در زیر به آن ها اشاره می شود تا کاربرد گیاهان تراژن بیشتر روشن گردد.

تعویض ناحیه ساختار در ژن های کریستالی

بیشترین زهرابه های کریستالی فعال، دارای یک ساختار مشترک وازسه ناحیه (Domain) تشکیل شده اند:

- ناحیه اول با انتهای آمینی (N-terminus Domain I) از ترکیبات سلولی غشاء روده می باشد و در تشکیل سلول های اپی تل روده (Epithel cells) و تولید کننده حفره های ریز (pores) آن مؤثر است
- ناحیه دوم برای تولید پذیرنده ها (receptors) و مسئول ویژگی های خاص (specificity) است

- ناحیه سوم با انتهای کربنی (C-terminus Domain III) هم مسئول تولید ویژگی های پذیرنده است

زهرابه های هیبرید را می توان با تعویض ناحیه ساختاری آن ها به سمیت بیشتری تبدیل کرد، بعنوان مثال با ادغام ناحیه ساختاری سوم از زهرابه (Cry 1Ac) با ناحیه های اول و دوم زهرابه کریستال یک (Cry 1) به دست آورد (Karlova *et al.*, 2005). با حشرات پلی فاژ هم مانند *Spodoptera litura* که به صورت معمول دارای ژن مقاوم به توکسین Cry 1 هستند، می توان با تعویض ناحیه های ساختاری در توتون و پنبه تراژن مبارزه کرد (Sigh *et al.*, 2004). احتمالاً توکسین های هیبرید، به پذیرنده های دیگر نسبت به پذیرنده های اصلی و غیر هیبرید جذب می شوند لذا این راهبرد امکانات دیگری را برای تهیه مقاومت بازمی کند.

بازدارنده های (Inhibitors) آنزیم پروتئاز

برای جلوگیری از متابولیسم پروتئین حشرات از فعالیت آنزیم پروتئاز (PI) آن ها جلوگیری می شود. این امید وجود دارد که با بروز صفات ارثی گیاهان تراژن، مکانیزم مؤثر جدیدی غیر از زهرابه بی - تی بوجود آید (Gatehouse, 1995). تاکنون، اثرگذاری عملی گیاهان تراژن کمتر از حد انتظار است (Christou *et al.*, 2006). دلیل این امر، مربوط به تنوع زیاد ژنتیکی پروتئاز و بالا بودن ویژگی بازدارندگی این آنزیم است. حتی در صورت مخلوط کردن ترکیبی از این آنزیم ها مانند پروتئاز یک و دو سیب زمینی (Potato PI-PII) و کاربوکسی پپتیداز (Carboxypeptidase)، باز هم اثربازدارندگی (PCI-Inhibitors) آن ها به اندازه ای است که قادر باشند از پروتئاز روده جلوگیری کنند (Abdeen *et al.*, 2005). در هر صورت آینده بازدارنده های پروتئاز، در ترکیب آن ها با سایر ژن ها مانند اکوایستاتین (Equistatin) از شقایق دریائی (Seeanemone) یا لکتین های گیاهی (lectins) قرار دارد.

بازدارنده های آنزیم آلفا آمیلاز (Alpha-Amylase- Inhibitors)

کاربرد بازدارنده های آلفا- آمیلاز بر اساس قطع متابولیسم نشاسته در حشرات است. زیرا آنزیم آلفا- آمیلاز مسئول تجزیه و هیدرولیز نشاسته به ترکیبات آلفا گلیکوزید α -D-Glucose و سایر ترکیبات مشابه نشاسته است. طبق این اصل بازدارنده های آنزیم آلفا- آمیلاز را از لوبیا و گندم همسانه

سازی، آن‌ها را شناسائی و به گیاه آرابی دوپسيز (*Arabidopsis*) وارد کرده اند (Titarenko & Chrispeels, 2000). چون این آنزیم‌ها به مقدار زیادی در ریشه تولید می‌شوند، ذرت تراژن حامل آنزیم آلفا- آمیلاز می‌تواند از آفت ریشه ای ذرت (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) جلوگیری و با آن مبارزه کند. در ساختمان سوسک آفت ریشه ای ذرت که به گیاهان تراژن حامل آنزیم بازدارنده آلفا- آمیلاز حمله کرده بودند، توانسته اند کاهش فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز را اندازه گیری کنند و تأثیرگذاری آن را در مبارزه با آفت ثابت نمایند (Titarenko & Chrispeels, 2000). در این مورد تحقیقات بیشتری در آینده مورد نیاز است.

لکتین های گیاهی (Plant lectins)

لکتین های گیاهی گروهی از قند های ناهمگن هستند که قادر به چسبیدن به پروتئین می باشند و نقش حفاظتی در مقابل گیاه خواران Herbivore دارند. لکتین ها تأثیر منفی در رشد و زندگی حشرات متعلق به خانواده های متفاوت می گذارند (Shuckle & Murdock, 1983; Czaplá & Lang, 1990; Habibi et al., 1992; Powell et al., 1993; Pawell et al., 1995). ذرت تراژن حامل لکتین جوانه گندم (wheat germ agglutinin = WGA) اثر سمیت متوسط در روی *O. nubilalis* و *Diabrotica* sp. داشته است (Maddock et al., 1991). لکتین (WGA) و لکتین (phaetohaemoglutinin = PHA) در حشرات مکنده اثر سمیت قوی دارند. وجود لکتین در گیاهان تراژن برای مبارزه با حشرات Hemipteroidea موفقیت خوبی داشته است. سیب زمینی تراژن حامل لکتین (GNA) از گل حسرت (*Galanthus nivalis* (snowdrop) سبب کاهش آلودگی به شته *Myzus persicae* شده است (Gatehous et al., 1996).

پروتئین های قابل ادغام

از خواص دیگر لکتین گل حسرت (GNA)، توانائی آن برای حمل توکسین های دیگر است. بر طبق این اصل ادغام لکتین گل حسرت با Allatostatin ترکیب (GNA-allatostatin) را فراهم کرد و هم ادغام (fusion) لکتین گل حسرت (GNA) با پروتئین سم اعصاب عنکبوت (GNA-SFI1) در *Pichia pastoris* را ممکن ساخت. این ترکیب پروتئین- لکتین، اثر حشره کشی روی لارو های پروانه *Lacanobia oleracea* می گذارد در صورتی که لکتین و یا پروتئین هر کدام به تنهایی

هیچ اثری روی لاروهای این پروانه ندارند (Fitches *et al.*, 2002, 2004). نحوه اثر حشره کشی بدین صورت است که لکتین (GNA) می تواند مستقیماً ماده سمی را به همولنف haemolymph حشرات منتقل کند. همچنین ترکیبی از بی - تی با لکتین درجه سمیت این ترکیب را افزایش داده و طیف وسیع تری از حشرات را دربر می گیرد، درحالی که بی - تی بدون ترکیب با لکتین، چنین اثری ندارد (Mehlo *et al.*, 2005). در اثر ادغام لکتین و پروتئین، پذیرنده های بیشتری این ترکیب را شناسائی می کنند و در نتیجه از ویژگی پذیرنده ها و از تعداد آن ها کاسته شده و به سمیت ترکیب، افزوده می شود.

منابع غیر عادی مواد حشره کشی

فتوربدوس (*Photorhabdus*) و گسنوربدوس (*Xenorhabdus spp.*) همزیست های باکتریایی هستند که می توانند بیماری را در نماتد ها (entomopathogenic) باشند و سمی تولید می کنند که اثر آن وسیع تر و با طیف بیشتر از توکسین بی - تی است اما ویژگی های خاص بی - تی را ندارند (Chattopadhyay *et al.*, 2005). این توکسین ها به صورت معمول سمی نیستند اما سبب عفونت سلولی یا Sepsis در قسمت روده می شوند که منجر به مرگ حشره می گردد. دانشمندان توانسته اند تعداد زیادی ژن در دو جنس باکتری مذکور شناسائی کنند، که توکسین های بزرگی را بدون شباهت با توکسین های مشهور، کد می کنند (Williamson & Kaya, 2003). انتقال صفات ارثی ژن توکسین آ، از *Photorhabdus luminescens* به گیاه *Arabidopsis* اثر حشره کشی قوی در پروانه ها و اثر متوسط حشره کشی در سوسک ها داشته است (Liu *et al.*, 2003).

از باکتری *Bacillus thuringiensis* علاوه بر توکسین های کریستالی (Cry-Toxins) در مرحله تکثیر (reproductive phase)، زهرابه ای هم در مرحله رشدی (Vip = vegetative) (insecticidal protein) شناسائی شده است که برای آفات *Agrotis sp.* و *Spodoptera sp.* سمی می باشد (Estruch *et al.*, 1996). از باکتری *Bacillus cereus* هم توانسته اند زهرابه ای در مرحله رشدی (Vip) را جداسازی کنند که دارای اثرات حشره کشی است (Estruch *et al.*, 1997). این زهرابه روی طیف دیگری از حشرات هم تأثیر دارد، اما دارای توالی های خودی بسیار کم با توالی زهرابه کریستالی (Cry-Proteins) می باشد (Yu *et al.*, 1997; de Maagd *et al.*, 2003). مکانیزم اثرگذاری زهرابه های کریستالی (Cry-Proteins) سبب انحطاط سلول های

اپی تل روده می گردد. پنبه های تراژن با ژن های پروتئین توکسین مرحله رشدی (Vip) امکان دارد در سال 2006 در آمریکا به بازار بیاید.

همچنین دانشمندان توانستند ژن های درحشرات شناسائی کنند که پروتئین های حشره کش ها را کد می کنند. به عنوان مثال درتوتون های تراژن پروتئین ای به نام (teratocyte secretory protein) وارد کرده اند که منشاء اصلی آن ها از بیمارگر های خارجی پروانه ها (hymenopteran endoparasitoid) هستند. این پارازیتوئید ها (*Microplitis croceipes*) به صورت معمول برای مبارزه بیولوژیکی به کاربرده می شود. توتون های تراژن مقاومت بالائی علیه آفات پروانه ای نشان داده اند (Maiti et al., 2003).

دفاع درونی (endogen) گیاهان

تحقیقات امروز در مرحله روشن کردن ارتباط مولکولی بین گیاه و گیاه خواران (Herbivora) است. کاملاً روشن است که گیاه در صورت تغذیه شدن، از راه های متفاوت از خود دفاع می کند. چگونگی مولکولی این دفاع، از بررسی های امروزه محققین است (Baldwin et al., 2001). با استفاده از اسپکترومترهای مدرن (Micro rays) توانسته اند از گیاه *Arabidopsis* که مورد حمله حشرات برگ خوار قرار گرفته بود، در حدود 700 مرتبه آنزیم mRNAs بیشتری در وضعیت نسخه برداری اندازه گیری کنند تا در همان گیاه که برگ های آن مورد تغذیه قرار نگرفته بود. هرمس مایسر و همکارانش (Hermsmeiser et al., 2001)، مقدار افزایش آنزیم mRNAs در برگ توتون که مورد حمله برگ خوار ای قرار گرفته است، را حدود 500 برآورد می کنند. بررسی ها ثابت کرده است که آرایش ژن ها در وضعیت دفاع گیاه بسیار منظم است. در حالی که از نظم معمولی ژن های مسئول رشد در موقع حمله گیاه خوارها کاسته می شود (Hui et al., 2003). نقش دقیق بیشتر این ژن ها در هر دو صورت کاملاً مشخص نیست. اما فعالیت متابولیسمی اسید سالیسیل (SA)، اتیلن، سیتوکینین و اسید جاسمون (JA) در حمله گیاه خواران بیشتر می شود. افزایش فعالیت مشابه ای هم در گیاه *Arabidopsis* مشاهده شده است (Chen et al., 2002) که مربوط به متابولیسم و سیگنال ها (signaling pathways) است. این سیگنال ها امکانات جدیدی را برای تهیه گیاهان تراژن مقاوم به حشرات را فراهم می کنند. موادی مانند اسید جاسمون (JA) نه تنها یک سیگنال بلکه شبکه ای از سیگنال ها را به وجود می آورد (Rijo et al., 2003). در موتانت های گیاه *Arabidopsis* که

در آن ها سه سیگنال بالا هدایت نشده بود از مقدارو تأثیر گلوکوزینولات (GS) به طور مشخص کاسته شده بود. در وضعیت متوقف شدن اسید جاسمون JA از مقدار گلوکوزینولات GS هم کاسته شد، در حالی که با متوقف شدن اسید سالیسیل SA، به مقدار گلوکوزینولات GS افزوده می شود (Mewis *et al.*, 2005). افزایش گلوکوزینولات اثرات منفی روی حشرات گیاه خوار Herbivora دارد. اما محققین تاکنون موفق به تهیه مصنوعی این سیگنال ها ی طبیعی نشده اند. علت این امر نبودن اطلاعات لازم و کافی در هماهنگی و چگونگی طرز کار سیستم ژن های مختلط بوده است (Dixon, 2005).

چشم انداز آینده :

از فناوری های ذکر شده در این بخش در تهیه گیاهان تراژن مقاوم به حشرات، فقط بی - تی اثر عملی مبارزه با آفات را داشته است. تحقیقات زیادی برای پیدا کردن مواد جایگزین دیگری انجام می شود. این بررسی ها نشان گر آن است که در آینده امکانات دیگری در اصلاح نباتات سنتی در کنار بی - تی وجود خواهد داشت. ورود گیاهان تراژن حامل زهرابه مرحله رشدی باکتری (Vip) به بازار آمریکا نشان می دهد هنوز بازار گیاهان تراژن مقاوم به حشرات باز و به هیچ وجه اشباع نشده است.

Literature:

- Abdeen, A., Virgos, A., Olivella, ESCHERICHIA, Villanueva, J., Aviles, X., Gabarra, R., Prat, S., 2005: Multiple insect resistance in transgenic tomato plants overexpressing two families of plant proteinase inhibitors. *Plant Molecular Biology* 57, 189-202.
- Avisar, D., Keller, M., Gazit, ESCHERICHIA, Prudovsky, ESCHERICHIA, Sneh, B., Zilberstein, A., 2004: The role of *Bacillus thuringiensis* Cry1C and Cry1E separate structural domains in the interaction with *Spodoptera littoralis* gut epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 279, 15779-15786.
- Baldwin, I.T., Halitschke, R., Kessler, A., Schittko, U., 2001: Merging molecular and ecological approaches in plant insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 351-358.
- Caroll, J., Ellar, D.J., 1993: Proteolytic processing of coleopteran specific δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *European Journal of Biochemistry* 214, 771-778.
- Chattopadhyay, A., Bhatnagar, N.B., Bhatnagar, R. 2005: Bacterial insecticidal toxins. *Critical Review in Microbiology* 30, 33-54.

- Chen, W.Q., Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G.Z., Whitham, S.A., 2002: Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14, 559-574.
- Choma, C.T., Surewitz, W.K., Carey, P.R., Pozsgay, M. Raynor, T., 1990: Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*: structural implications. *European Journal of Biochemistry* 189, 523-527.
- Christou, P., Capell, T., Kohli, A., Gatehouse, J.A., Gatehouse, A.M.R., 2006: Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends in Plant Science* 11, 302-308.
- Crickmore, N., Ziegler, D.R., Fietelson, J., Schnepf, ESCHERICHIA, Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J, Dean, D.H., 1998: Revision of the nomenclature for *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Review* 62, 807-813.
- Czapla, T.H., Lang, B.A., 1990: Effects of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelida) *Escherichia J Economic Entomology* 83, 2480-2485.
- de Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., Schnepf, H.ESCHERICHIA, 2003: Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review in Genetics* 37, 409-433.
- Dixon, R.A., 2005: Engineering of plant natural product pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 329-336.
- Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A., Koziel, M.G., 1996: Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc Ntl Acad Sci USA* 93, 5389-5394.
- Estruch, J.J., Carozzi, N.B., Desai, N., Duck, N.B., Warren, G.W., Koziel, M.G., 1997: Transgenic plants: an emerging approach to pest control. *Nature Biotechnology* 15, 137-141.
- Ferre, J., Van Rie, J., 2002: Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* 47, 501-533.
- Fitches, ESCHERICHIA Audsley, N., Gathouse, J.A., Edwards, J.P., 2002: Fusion proteins containing neuropeptides as novel insect control agents: snowdrop lectins delivers fused allatostatin to insect haemolymph following oral ingestion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 1653-1661.
- Fitches, ESCHERICHIA, Edwards, M.G., Mee, C., Grishin, ESCHERICHIA, Gatehouse, A.M.R., Edwards, J.P., Gatehouse, J.A., 2004: Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snodrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. *Journal of Insect Physiology* 50, 61-71.
- Gatehouse, A.M.R., Down, R.ESCHERICHIA, Powell, K.S., Sauvion, N., Bahbe, Y., Newell, C.A., Merryweather, A., Hamilton, W.D.O., Gatehouse, J.A., 1996: Transgenic potato plants with resistance to the peach potato aphid *Myzus persica* *Escherichia Entomologia Experimentalis et Applicata* 79, 295-307.
- Gatehouse, L.N., 1995: Novel genes for insect resistance in transgenic plants. PhD Thesis Durham University, UK
- Gill, S.S., Cowles, ESCHERICHIAA., Pietrantonio, F.V., 1992: The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology* 37, 615-636.

- Habibi, J., Backus, ESCHERICHIAA., Czapla, T.H., 1992: Effect of plant lectins on survival of potato leaf hopper. Proceedings XIX International Conference of Entomology, Beijing, China, pp. 373.
- Hermesmeier, D., Schittko, U., Baldwin, I.T., 2001: Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. *Plant Physiology* 125, 683-700.
- Hoftey, H. Whiteley, H.R., 1989: Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Review* 53, 242-255
- Hui, D.Q., Iqbal, J., Lehmann, K., Gase, K., Saluz, H.P., Baldwin, I.T., 2003: Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*: V. Microarray analysis and further characterisation of large scale changes in herbivore induced mRNAs. *Plant Physiology* 131, 1877-1893.
- Karlova, R., Weemen-Hendriks, M., Naimov, S., Ceron, J., Dukiandjiev, S., de Maagd, R.A., 2005: *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins Cry1Ac domain III enhances activity against *Heliothis virescens* in some, but not all Cry1-Cry1Ac hybrids. *Journal of Invertebrate Pathology* 88, 169-172.
- Knowles, B.H., Dow, J.A.T., 1993: The crystal endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanisms of action on the insect gut. *Bioassays* 15, 469.
- Liu, D., Burton, S., Glancy, T., Li, Z.-S., Hampton, R., Meade, T., Merlo, D.J. 2003: Insect resistance conferred by a 283 kDa *Photobacterium luminescens* protein TcdA in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology* 21, 1222-1228.
- Maddock, S.ESCHERICHIA, Huffman, G., Isenhour, D.J., Roth, B.A., Raikhel, N.V., Howard, J.A. Czapla, T.H., 1991: Expression in maize plants of wheat germ agglutinin, a novel source of insect resistance. *Escherichia 3rd International Congress of Plant Molecular Biology*, Tucson, Arizona, USA
- Maiti, I.B., Dey, N., Pattanaik, S., Dahlman, D.L., Rana, R.L., Webb, B.A., 2003: Antibiosis-type insect resistance in transgenic plants expressing a teratocyte secretory protein (TSP14) gene from a hymenopteran endoparasitoid (*Microplitis croceipes*). *Plant Biotechnology Journal* 1, 209-219.
- McLaren, J.S., 1998: The success of transgenic crops in the USA. *Pesticide Outlook* 9, 36-41.
- Mewis, I., Appel, H.M., Hom, A., Raina, R., Schultz, J.C., 2005: Major signaling pathways modulate *Arabidopsis* glucosinolate accumulation and response to both phloem feeding and chewing insects. *Plant Physiology* 138, 1149-1162.
- Powell, K.S., Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A. Gatehouse, J.A., 1993: Antimetabolic effects of plant lectins and plant and fungal enzymes on the nymphal stages of two important rice pests, *Nilaparvata lugens* and *Nephotettix cinciteps*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 66, 119-126.
- Powell, K.S., Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A. Gatehouse, J.A., 1995: Antifeedant effects of plant lectins and an enzyme on the adult stage of the rice brown plant hopper *Nilaparvata lugens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 75, 51-59.
- Rojo, ESCHERICHIA, Solano, R., Sanchez-Serrano, J.J., 2003: Interactions between signalling compounds involved in plant defense. *Escherichia J Plant Growth Regulation* 22, 82-98.
- Schnepf, H.ESCHERICHIA, Whitley, H.R., 1981: Cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 2893-2897.
- Schwartz, J.L., Garneau, L. Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R., Rousseau, ESCHERICHIA, 1993: Lepidopteran specific crystal toxins from *Bacillus*

- thuringiensis* form cation and anion-selective channels in planar lipid bilayer. *J Membrane Biology* 132, 53-62.
- Shukle, R.H., Murdock, L.L., 1983: Lipoxygenase, trypsin inhibitor and lectin from soybeans: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *Environmental Entomology* 12, 787-791.
- Sharma, H.C., Sharma, K.K., Seetharama, N.n Ortiz, R., 2000: Prospects for using transgenic resistance to insects in crop improvement. *J Biotechnology*, 3, 76-95.
- Singh, P.K., Kumar, M., Chaturvedi, C.P., Yadav, D., Tuli, R., 2004: Development of hybrid delta endotoxins and its expression in tobacco and cotton for control of polyphagous pest *Spodoptera litura*. *Transgenic Research* 13, 397-410.
- Taylor, R., Tippett, J., Gibb, G., Pells, S., Pike, D., Jordan, L., Ely, S., 1992: Identification and characterisation of a novel *Bacillus thuringiensis*-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larva *Escherichia* *Molecular Microbiology* 7, 1211-1217.
- Tabashnik, B.ESCHERICHIA, Carriere, Y., Dehenny, T.J., Morin, S., Sisterton, M.S., Roush, R.T., Shelton, A.M., Zhao, J.-Z., 2003: Insect resistance to transgenic Bt-crops: lessons learned from the laboratory and the field. *Journal of Economic Entomology* 96, 1031-1038.
- Titarenko, ESCHERICHIA, Chrispeels, M.J., 2000: cDNA cloning, biochemical characterisation and inhibition by plant inhibitors of the α -amylases of the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera*. *Insect Biochem Mol Biology* 30, 979-990.
- Van Rie, J., Jansens, S., Hoftey, H., Degheele, D., van Mellaert, H., 1989: Specificity of *Bacillus thuringiensis*- endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid gut of target insects. *European Journal of Biochemistry* 186, 239-247.
- Vaughn, T., Cavato, T., Brar, G., Combe, T., DeGooyer, T., Ford, S., Groth, M., Howe, A., Johnson, S., Kolacz, K., Pilcher, C., Purcell, J., Roman, C., English, L., Pershing, J., 2005: A method of controlling corn rootworm feeding using a *Bacillus thuringiensis* protein expressed in transgenic maize *Escherichia* *Crop Science* 45, 931-938.
- Williamson, V.M., Kaya, H.K., 2003: Sequence of a symbiont. *Nature Biotechnology* 21, 1294-1295.
- Yu, C.G., Mullins, M.A., Warren, G.W., Koziel, M.G., Estruch, J.J., 1997: The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl Environ Microbiology* 63, 532-536.

کاربرد مهندسی ژنتیک در بهبود گیاهان زراعی مقاوم به قارچ های بیماری زا

دیتمار جی اشتهاال، کلاوس اشמיד و راینهارد نهلس

Dietmar J. Stahl, Klaus Schmidt & Reinhard Nehls

PLANTA Angewandte Pflanzengenetik & Biotechnologie GmbH, Grimsehlstraße 32, 37555 Einbeck

(r-nehls@kws.de)

پیشگفتار

پس از اولین انتشار تحقیقات مربوط به گیاهان زراعی مقاوم به قارچ ها با مهندسی ژنتیک (Broglie *et al.*, 1991) نتایج بی شماری به دست آمده است. با وجود این که با مقالات متعددی نشان داده شده است که مقاومت گیاهان به قارچ ها را می توان با راهبردهای متفاوت بهبود بخشید، نتایج به دست آمده تاکنون کافی به کاربرد عملی آن نمی باشد. نتایج به دست آمده از بیوتکنولوژی برای تهیه گیاهان مقاوم به ویروس ها و گیاهان مقاوم به حشرات با تهیه گیاهان مقاوم به قارچ ها متفاوت است. از طرفی استفاده عملی از گیاهان مقاوم به ویروس ها و حشرات، علیه تعداد زیادی از آفات امکان پذیر شده است. تهیه مقاومت علیه قارچ ها بستگی به نتایج حاصله از تحقیقات علوم پایه ای تجزیه مولکولی در رابطه با اثر متقابل قارچ و میزبان دارد. نتایج به دست آمده از علوم زیستی در 20 سال گذشته با انگیزه بهتر کردن مقاومت علیه قارچ ها و بررسی ژن های مقاوم به قارچ ها به دقت آزمایش و مورد پی گیری قرار گرفته است.

واحدهای بیوتکنولوژی، گیاه پزشکی و شرکت های تهیه کننده بذرمادری در این بررسی ها پیش رو بوده اند. هزینه تحقیقات ایجاد گیاهان تراژن و کسب مجوز برای کشت این گیاهان بسیار بالا است. همچنین بررسی مقاومت گیاهان تراژن به قارچ ها در مزرعه و در طول فصل زراعی و بررسی ظهور صفات احتمالی بعدی در تراژن ها مورد علاقه شرکت های تولید بذراست. گیاهان مقاوم از نظر شرکت های تولید بذر بایستی در تمام طول فصل دارای مقاومت کامل به قارچ های زیان آورو مقاومت نسبی به پاتوژن های کم اهمیت باشند. این بررسی ها بایستی با حداقل هزینه فراهم شود. از طرف دیگر کاشت این گونه گیاهان نباید منجر به کاهش محصول و نباید سبب افزایش حساسیت بیمارگر های بی اهمیت شود و در نهایت بایستی مورد قبول مردم جامعه هم قرار گیرد.

جدول شماره 1 : واکنش مقاومتی گیاهان پس از انتقال پروتئین های پی - آر (PR-Proteines)

انتقال پروتئین های پی - آر به صورت انفرادی					
منابع مورد استفاده	کاهش عفونت	پاتوژن یا بیمارگر	گیاهان کننده دریافت (r) آر	گیاهان اعانه دهنده	پروتئین وارد شده s
Alexander et al., 1993	none 30 % (14 d.p.i) 42% (7 d.p.i) 24 % (9 d.p.i)	<i>C. nicotianae</i> <i>P. parasitica</i> <i>P. nicotianae</i>	توتون	توتون	PR-1a
Yoshikawa et al., 1993	Very streng Very streng	<i>P. nicotianae</i> <i>Alternaria alternata</i>	توتون	سویا	PR-2 (Glucanase)
Broglie et al., 1991 Grison et al., 1996	40 - 50% none 40 - 50% 21% 30% 70%	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Phytium spp.</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>C. concentricum</i> <i>Phoma lingam</i> <i>S. sclerotiorum</i>	توتون منداب منداب ¹	لویبا گوچه فرنگی	PR-3 (Chitinase)
Liu et al., 1994 Zhu et al., 1996	none yes yes	<i>P. parasitica</i> <i>P. infestans</i> <i>P. infestans</i>	توتون سیب زمینی سیب زمینی	توتون سیب زمینی	PR-5 (Osmotin)
Terras et al., 1995	75 %	<i>Alternaria alternata</i>	توتون	تربچه	PR-12 (Defensin)
انتقال پروتئین های پی - آر به صورت مختلط PR-Proteine (Synergy)					
Zhu et al., 1994	40 - 50% 20 - 30% 80 - 90%	<i>Cercospora nicotianae</i>	توتون	برنج یونجه	Chitinase I Glucanase II ChitI x GluII
Jach et al., 1995	10 - 40% 20 - 30% 20 - 50% max. 60% max. 60%	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>R. solani</i> , A. <i>alter-nata</i> , B, <i>cinerea</i>	توتون	جو	RIP TypI Chitinase II Glucanase II Chit II/Glu II Chit II/RIP
Melchers and Stuiiver, 2000	stark stark stark stark	<i>Alternaria dauci</i> <i>Alternaria radicina</i> <i>Cercospora carotae</i> <i>Erysiphe heraclei</i>	¹ هوچ	توتون	Chitinase I ² + Glucanase I ²

1 بررسی مقاومت با شرایط مزرعه
2 نشانه های پروتئین تغییر داده شده است (از خلاء به آپوپلاست)

نظریه های فنی

پی گیری نظریه های فنی آئینه پیشرفت علوم پایه ای مولکولی مقاومت علیه بیماری های گیاهی و دامی است. بیشتر این نظریه ها بر پایه فاکتورهای مقاومت اکتسابی از گیاهان استوار شده است. لذا اغلب بررسی های نیم قرن گذشته 1990 به بررسی توانائی ژن ها و تولیدات آن ها، مانند پروتئین های ایجاد شده در رابطه با عوامل بیماری زا بنام پروتئین های پی - آر بیمارگر pathogenesis related (PR)- protein یا ترکیب آنزیم های فیتوالکسین (phytoalexin synthase) از نظر ضد قارچی بودن آن ها متمرکز شده بود. محققین در این بین، اثرات ترکیبات ترانسسانی سیگنال گیاهی (transduction signal) که از ژن به ژن منتقل می شود را هم شناسائی و آزمایش کرده اند. جداسازی فاکتورهای مقاوم که منشأ میزبان گیاهی ندارند، از نظریه های ممکن در آینده است. علاوه بر آن، فاکتورهای ایمنی اکتسابی یا ارثی (innate & acquired immunity) ارگانیزم های حیوانی هم برای تحقیقات مورد استفاده قرار می گیرد (Peschen *et al.*, 2004; Osusky *et al.*, 2005). استفاده از فاکتورهای حیوانی، بیشتر جنبه آکادمیک دارد و امکان استفاده از آن ها در گیاهان به علت منشأ تبار حیوانی، مورد استقبال مردم قرار نگرفته و نتایج خوبی به دست نیآمده است.

بروز اثرات ضد قارچی ژن ها

پروتئین های پی-آر

پروتئین های پی - آر pathogenesis related (PR)- protein پروتئین هائی هستند که در گیاهان سالم به مقدار بسیار کم و یا اصلاً یافت نمی شوند، اما در اثر استرس های زیستی (biotic) یا غیرزیستی (abiotic) در گیاه بوجود می آیند. اکثر پروتئین های پی - آر اثر ضد قارچی مستقیم در محیط آزمایشگاه (*in vitro*) دارند یا این که با سیستم دفاعی گیاه همکاری می کنند. تا سال 2001 تعداد 14 نوع از پروتئین های پی - آر از توتون و گوجه فرنگی شناسائی و طبقه بندی شده بود. پروتئین های آنریمی اند و - بتا - گلوکاناز (PR-2) endo-beta- glucanase، کیتینازهای (PR-3, PR-4,) proteinase (PR- 7) و پروتئیناز chitinase (PR-8, PR-11) دیواره سلولی قارچ ها راهیدرولیز کرده و سبب ضعیف شدن آن ها می شوند. پروتئین نزدیک به تاماتین (PR- 5)

thaumatin ؛ پروتئین دهنزین گیاهی (PR-12) plant defensin، تیونین (PR-13) thioine و پروتئین منتقل کننده چربی (PR-14) lipid transfer protein سبب تغییر نفوذ پذیری (permeability) غشاء سلولی قارچ ها و باکتری ها می شوند. پراکسیداز ها از گروه پروتئین های پی – آر (PR-9) سبب ضخیم شدن دیواره سلول گیاهی درواکنش به نفوذ قارچ ها می شود. پروتئین پی – آر (PR-1) اثر مستقیم ضدقارچی علیه امیست ها (Oomycets) دارد (van Loon, 2001). واکنش کیتیناز (chitinase) لوبیا درتوتون و منداب با کمک پیشبر (promoter) 35S اولین موفقیت در بهبود مقاومت گیاه علیه قارچ بود (Broglie et al., 1991). این موفقیت سرآغاز پروژه های دیگری بود که پروتئین پی – آر به گیاهان منتقل شد. تراریختن تک تک ژن های پروتئین پی – آر PR-1، PR-2، PR-3، PR-5 و PR-12 سبب افزایش مقاومت علیه قارچ های بیماری زا و مقاومت در مقابل امیست ها درتوتون، منداب، سیب زمینی و هویج گردید. از امکانات دیگر افزایش مقاومت می تواند تراریختن پروتئین های پی – آر مختلط باشد (جدول شماره 1). تراریختن مشترک کیتیناز و گلوکناز در توتون درمقایسه با تراریختن تک تک این ژن ها مقاومت بیشتری علیه *Cercospora nictotianae* (Zhu et al., 1994) نشان داد. اثر تراریختن مشترک پروتئین های پی – آر (synergistic) مانند کیتیناز و گلوکناز، یا کیتیناز و پروتئین غیرفعال کننده ریبوزم RIP (Ribosom Inacting Protein) علیه *Rhizoctonia solani* درتوتون گزارش شده است (Jach et al., 1995). درحالی که بیشترین بررسی گیاهان تراژن درگلخانه یا دراطاقک حرارت ثابت انجام شده است، ملچرس و استیور (Melchers & Stuver, 2000) آزمایش های خود را درمزرعه انجام داده و توانستند با تراریختن مشترک کیتیناز و گلوکناز مقاومت خوبی درگیاهان تراژن به دست آورند. ترکیب سیستمیک تعدادی از پروتئین های پی – آر درگیاه مدل توتون نشان داد که تأثیری درافزایش مقاومت نداشته یا این که اصلا مقاومتی به وجود نیامد (گزارش شفاهی J. Ryals).

فیتوالکسین

فیتوالکسین، مولکول های ضد میکروبی کوچکی هستند که در اثر ایجاد استرس در گیاه به وسیله عوامل زیستی و غیرزیستی بوجود می آیند. ساختمان شیمیائی فیتوالکسین هر گیاه ویژگی خود را دارد و با متابولیسم پیچیده ای بوجود می آید. بیوسنتز فیتوالکسین رسوراترول (Resveratrol) از درخت مویک استتتا می باشد. این فیتوالکسین از Malony-CoA و p-Coumaryl-CoA با یک مرحله آنزیمی با کاتالیز کردن رسوراترول (Resveratrol) به دست می آید. با انتقال ژن سنتز رسوراترول از درخت مو به گیاهان زارعی دیگر، می توان فیتوالکسین نوع دیگری از رسوراترول

تولید کرد. گیاهان توتون که با ژن های سنتز رسوراترول Vst1 و Vst2 تراریخته شده بودند، مقاومت قابل توجهی علیه *Botrytis cinerea* نشان دادند (Hain et al., 1993). با این فناوری مقاومت علیه بیمارگر های دیگری از گیاهان هم ایجاد گردید (جدول شماره 2). به این ترتیب گوجه فرنگی و سیب زمینی علیه *Phytophthora infestans* (گزارش چاپ نشده Stahl و Thomzik et al., 1997) و منداب علیه *Phoma lingam* و *Verticillium dahliae* مقاومت بیشتری در مزرعه و گلخانه نشان دادند (گزارش منتشر نشده Stahl).

جدول شماره 2 : واکنش مقاومت گیاهان زراعی پس از انتقال ژن های آنزیم سنتز رسوراترول (Resveratrol)

واکنش مقاومت گیاهان تراژن با آنزیم رسوراترول گیاهی			
منابع مورد استفاده	کاهش عفونت	بیمارگر	گیاه
Hain et al., 1993	50 %	<i>Botrytis cinerea</i>	توتون
Thomzik et al., 1997	40 – 70% 8 – 15 %	<i>Phytophthora infestans</i> <i>Botrytis cinerea</i>	گوجه فرنگی
Stahl (منتشر نشده)	40 % (5 d.p.i) 10 % (14 d.p.i.)	<i>Phytophthora infestans</i>	سیب زمینی
Stahl (unveröffentlicht)	30 – 35% 30 – 60%	<i>Phoma lingam</i> <i>Verticillium dahliae</i>	منداب

ترارسانی سیگنال

پس از بهینه سازی مقاومت از طریق انتقال پروتئین های پی - آر یا فیتوآلکسین، قدم منطقی بعدی بررسی ترارسانی سیگنال ژن گیاهی به گیاه دیگر (transduction) است، تا مقاومت بیشتری به دست آید. با افزایش ترارسانی سیگنال از راه بالا بردن مواد ساختاری سیگنال یا تولید بیش از حد پروتئین های تنظیم کننده (regulation protein) ترارسانی سیگنال به دست می آید. تولید اضافی

hydrogen peroxid از راه تراریختن آنزیم گلوکواکسیداز **Glucoseoxidase** بامنشاً میکروبی درسیب زمینی، توتون و پنبه سبب کاهش عفونت سیب زمینی به *Phytophthora infestans*، افزایش مقاومت توتون علیه *Rhizoctonia solani* و افزایش مقاومت پنبه علیه *Verticillium dahliae* شد. (Wu et al., 1995 ; Murray et al., 1999).

پروتئین تنظیم کننده NPR1 (non expressor of PR genes) ، مولکول کلیدی در تنظیم اسید سالیسیل گیاهی مربوط به واکنش های دفاعی گیاه است. تراریختن بیشترژن NPR1 در *A. thaliana* سبب تولید دو تا سه برابر پروتئین های پی - آر PR-1، PR-2 و PR-5 و افزایش مقاومت علیه *Peronospora parasitica* شد (Cao et al., 1998). ژن های خودی NPR در تعدادی از گیاهان یافت شده است . تراریختن بیشترژن AtNPR1 درگندم سبب افزایش مقاومت علیه *Fusarium graminearum* شده است (Makandar et al., 2006).

غیر از ترارسانی بیش از حد ترکیبات سیگنال، می توان از پروتئین های فعال تنظیم کننده هم استفاده کرد. پروتئین کیناز Proteinkinase فعال شده با میتوزن (Mitogen) که علامت اختصاری آن MAPK است، تحریکات فضای بین سلولی گیاهان را هدایت می کند . این واکنش در اثر حمله بیماریگر، در بافت ها وجود می آید. یامامیزو و همکارانش (Yamamizo et al., 2006) با استفاده از فرم فعال شده کیناز MAPK موفق به تولید مقاومت اکتسابی از ژن اکسیداز NADPH در گیاه شدند. در این فناوری با تراریزش MAPK و کنترل پیشبر بیماریگر گیاهی، باعث افزایش مقاومت درسیب زمینی علیه *Phytophthora infestans* و *Alternaria solani* می شود.

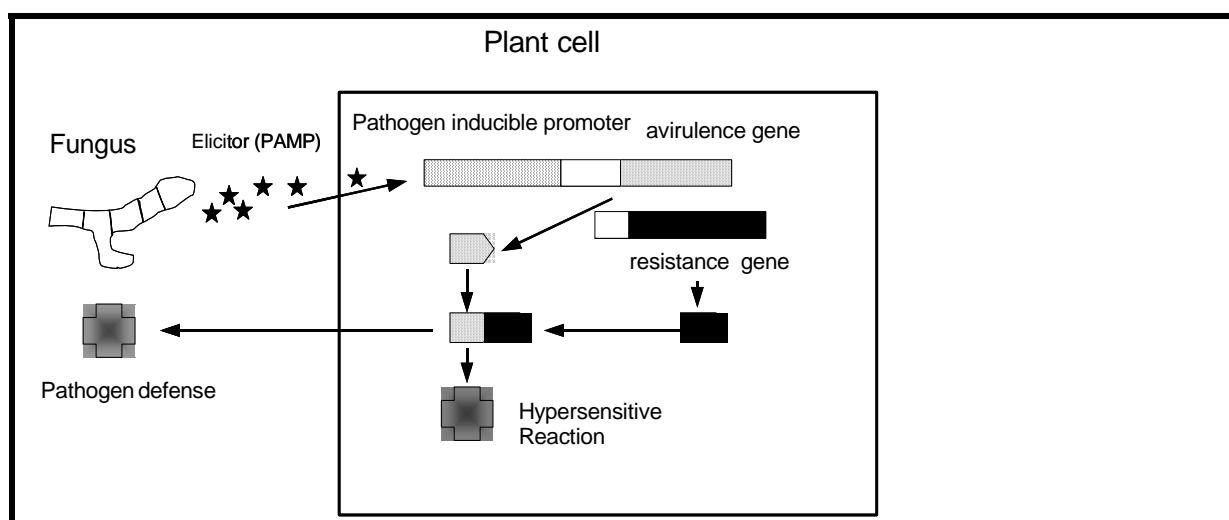
ایجاد واکنش فرا حساسیت (HR)

فرا حساسیت (HR) یک واکنش قابل رویت و مؤثر دفاع گیاه است که اغلب با ژن های مقاوم به عنوان واکنش دفاع دیده می شود. در محل عفونت در نتیجه واکنش دفاع گیاه بافت سلول های موضعی می میرند. اقدامات دیگری ذکر شده است که با انجام آن مرگ سلول یا واکنش فرا حساسیت در محل عفونت بوجود می آید. این برنامه به علت نتایج به دست آمده از توانایی بیشتری برخوردار است که مهم ترین آن ها از دوساختار تشکیل شده است. نخستین ساختار از ترکیبات تأثیرگذار است که سبب فرا حساسیت می شود و دیگری پیشبر ویژه بیماریگر است که فرا حساسیت در محل عفونت را متوقف می کند. استریتماتر و همکارانش (Strittmatter et al., 1995) با استفاده از ریبونوکلاز بارناز باکتری ها سعی کردند مرگ سلول ها را به صورت مصنوعی درسیب زمینی نظیر عفونت پاتوژنی بوجود

آورند. تراریختن ژن های بارناز (barnase) از طریق پیشبر ویژه بیمارگر (prp 1 - 1) تنظیم شد . پس از آن، بارستار (Barstar) که یک بازدارنده ویژه ریبونوکلئاز است، تولید شد که فعالیت غیرویه ای پیشبر (prp 1 - 1) را در بافت های غیرآلوده موازنه کند و در نتیجه تولید اسپر *Phytophthora infestans* در برگ های آلوده کاهش یافت.

کلروهمکارانش (Keller et al., 1999) با انتقال الیستور (elicitor) قارچ *Phytophthora cryptogea* با کنترل پیشبر توتون (hsr203J) توانستند واکنش فراساسیت را در گیاه توتون بوجود آورد. توتون های تراژن در مقابل قارچ های متعددی عفونت کمتری نشان دادند که می توان به کاهش آلودگی برگ ها به *Erysiphe cichoracearum* یا کاهش آلودگی جوانه ها به *Phytophthora parasitica* و کاهش خسارت وارده به ریشه از عفونت *Thielaviopsis basicola* اشاره کرد . ساختار اصلی ژنتیکی در ادغام ژن به ژن طبق نظریه ویت (Wit, 1992) با استفاده از روش دوترکیبی سبب استفاده از مکانیزم مقاومت ویژه نژاد با فناوری زیستی می شود.

ژن های - آر مقاوم گیاهی (R-genes) و ژن کم آزار میکروبی - آ- وی - آر (Avr-genes) در صورت ترارسانی به گیاه، ژن های - آر (R-genes) سبب واکنش دفاعی مربوطه می شود (شکل 1).



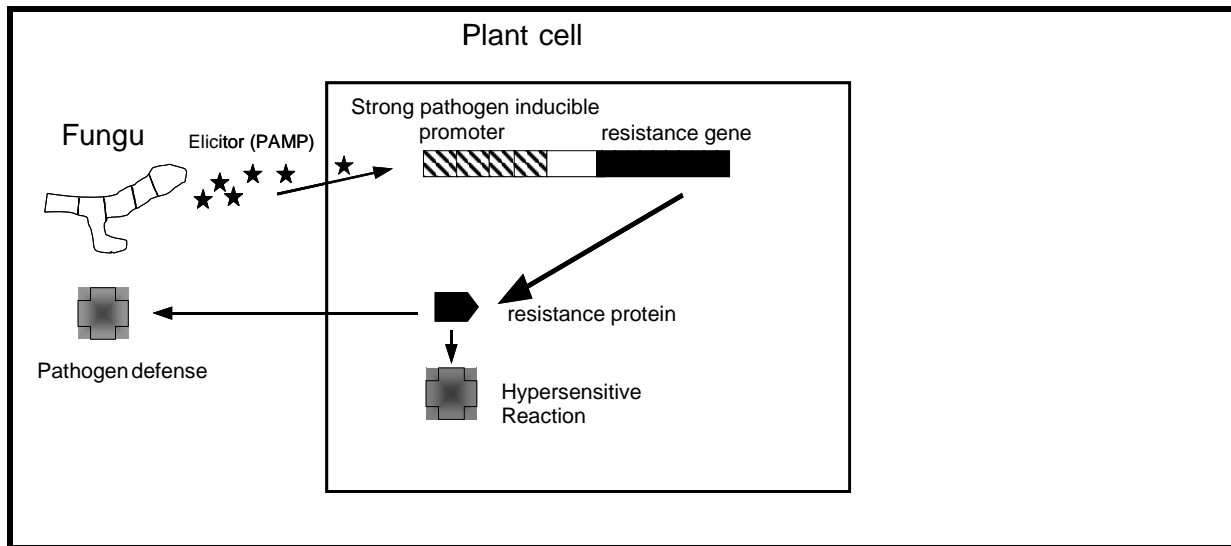
شکل 1: ایجاد واکنش فراساسیت (HR) ترارسانی مضاعف عامل بیماری زاو ژن کم آزار میکروبی باروش (de Wit, 1992)

با به کاربردن پیشبر ویژه بیمارگر، که از طریق تعدادی از بیمارگر ها می توان آن را فعال کرد، می توان با ترکیبات مقاومت ویژه نژادی، مقاومتی مؤثر باطیف وسیعی را فراهم کرد. این مقاومت باید نه

تنها درمقابل پاتوتیپ های یک عامل بیماری مؤثر باشد، بلکه درمقابل تعداد زیادی از عوامل بیماری های متفاوت هم مؤثر واقع شود. با وجود این که در سال 1990 این برنامه شروع شد اما در سال 1999 به موفقیت رسید. گوجه فرنگی که در آن ژن (Cf-9) و ژن کم آزار (Avr9) از قارچ *Cladosporium fulvum* تراریخته شده بود، مقاومت بالائی را علیه *Cladosporium fulvum* و *Oidium lycopersicum* نشان داد. بروزصفات ژن سی - اف 9 (Cf-9) تحت کنترل پیشبرکوتاه شده (gst 1) prp1-1 در گیاه گوجه فرنگی قرار گرفته بود (Joosten & de Wit, 1999).

نتایج اثر سایر الیسیتور ها (elicitor) در گیاهان زراعی دیگر هنوز گزارش نشده است. یکی از علل آن ویژگی ترکیبات ژنی است. به علت محدودیت تأثیر ژن های - آر (R-genes) در گیاهان یک خانواده (restricted taxonomic specificity) و نیاز ژن های - آر به ژن (Avr-genes)، وجداسازی آن ها، احتیاج به زمان و تحقیقات بیشتری است تا بتوان نتیجه این بررسی ها را ارزشیابی کرد.

شکل 2: ایجاد واکنش فراساسیت با ژن های مقاومت کسب شده پاتوژنی بدون حضور ژن های کم آزار (گزارش چاپ نشده، Stahl, Schmidt, Nehls)



جایگزین فنی استفاده مضاعف از ژن های R-genes و ژن های Avr-genes می تواند باعث، تراریخت بیش از حد ژن های R-genes، بدون حضور ژن های Avr-genes شود (شکل 2). تراریخت ژن های R-genes سبب فعال شدن ژن های - آر کنترل کننده ترارسانی سیگنال (signal transduction pathways) و افزایش مقاومت علیه بیماری های گیاهی می شود (Oldroyd &

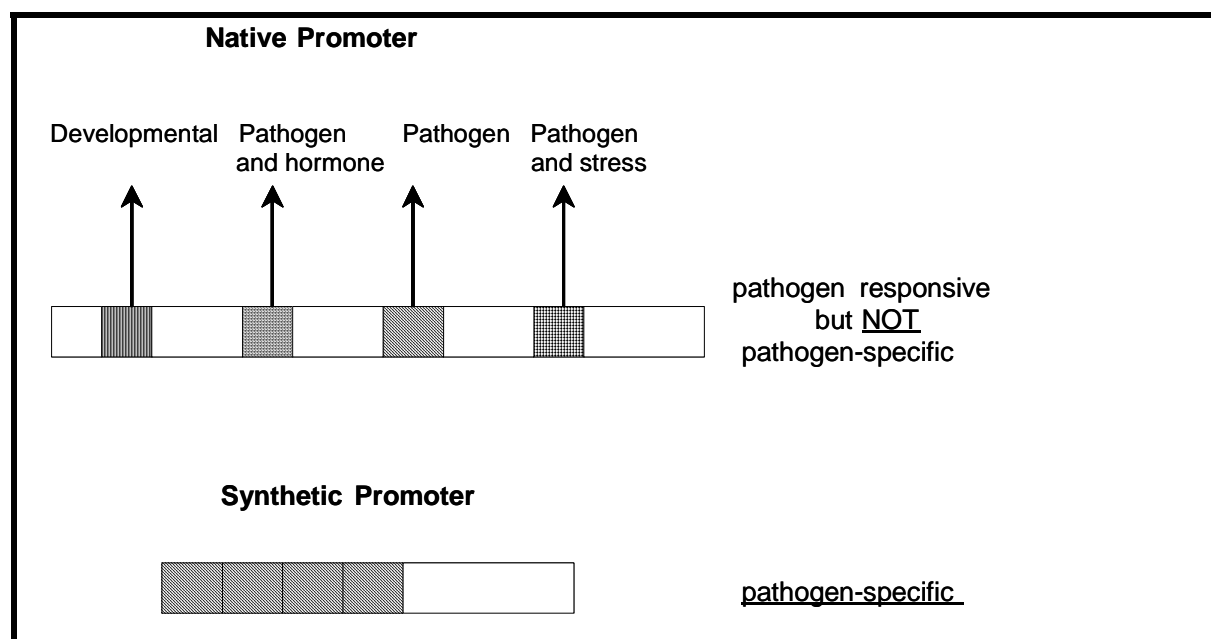
R- genes می تواند کوتولگی و ریززخمی باشد که با استفاده از پیشبرهای ویژه بیمارگر برطرف می شود

پیشبرهای (promoters) ویژه پاتوژن

برای اجرای راهبرد های متعدد و مؤثر که برپایه مقاومت اکتسابی طرح ریزی شده است، پیشبرهای ویژه بیمارگر مورد نیازی باشند. این پیشبرهای ویژه بیمارگر بایستی اثرگذاری موضعی خود را به زمان معینی درمحل عفونت محدود کنند. برای این کار تاکنون از ژن های پیشبرگیاهی مسئول پاتوژنی استفاده شده است، و در بعضی مواقع، در اثر کوتاه کردن این پیشبرها، ویژگی آن ها نیز بهتر شده است (Martini et al., 1993).

دلیل این موضوع به علت فعال شدن ژن های مسئول بیمارگر مانند پروتئین های پی - آر، نه تنها با عوامل زیستی، بلکه با استرس های غیرزیستی، تغییرات هورمونی و محرک های رشد است. حال سؤال پیش آمده این است که آیا پیشبرهای طبیعی با ویژگی های پاتوژنی اصلا وجود دارند؟ اما پیشبرهای مصنوعی با ویژگی پاتوژنی، آینده روشنی دارند (شکل 3).

شکل 3 : پیشبر مصنوعی ویژه پاتوژن براساس ساختار پیشبر طبیعی پروتئین های پی - آر. شکل مربع عناصر سیس ویژه (specific cis-element) را در داخل پیشبرها را نشان می دهند.



عناصرسیس (*cis elements*) مسئول بیماری زائی در پیشبرهای پروتئین پی - آر (PR) شناسائی، جداسازی و برای تولید پیشبرهای جدید مصنوعی به کار می برند. اختلاف تک تک عناصرسیس (*cis elements*) باهم و ترکیب این عناصر با یکدیگر امکان تولید پیشبرهای جدید ویژه را فراهم می سازد. این فنآوری اولین بار با قارچ *A. thaliana* درشوید آزمایش شد (Rushton *et al.*, 2002). پس از آن، این فنآوری در گندم (گزارش چاپ نشده اشמיד Schmidt) و چغندر قند (Klages *et al.*, 2004) هم با موفقیت گزارش شد.

اندوختن فرم ژن های - آر (R-genes) وحشی

غیراز پیشرفت در پیدا کردن منابع مقاومت می توان با بیوتکنولوژی، ژن های- آر یعنی فرم های مقاومت وحشی را جدا و مستقما به گیاهان زارعی منتقل کرد. با این فنآوری می بایستی از تلقیح های برگشتی نامطلوب جلوگیری و ژن های - آر را سریع تر در گیاهان زارعی ذخیره کرد. برای مثال جدا کردن و انتقال ژن های - آر R-genes Rpi-b1b1 مربوط به فیتوفتورا *Phytophthora infestans* از سیب زمینی های وحشی *Solanum tuberosum* به سیب زمینی های زارعی امروز می توان نام برد (Song *et al.*, 2003 ; van der Vossen *et al.*, 2003).

خنثی کردن پرازاری قارچ و فاکتورهای بیماری زا

اطلاعات موجود از پرازاری قارچ ها (virulence) و فاکتورهای بیماری زائی اجازه می دهد آن ها را خنثی و مقاومت گیاه را بهبود بخشید. تعدادی از قارچ های مرده روی (necrophyte) مانند *Botrytis cinerea* و *Sclerotinia sclerotiorum* در طول عفونت، مرگ از قبل طرح شده بافت و سلول ها (PCD) را تولید می کنند. با ترائخت ژن های ضد آپوپتتیک (animal antiapoptotic) گیاهی و حیوانی، مقاومت برگ های توتون علیه *Botrytis cinerea* و *Sclerotinia sclerotiorum* و مقاومت برگ ها و ریشه هویج علیه *Botrytis cinerea* و *T. basicola* را می توان افزایش داد (Dickman *et al.*, 2001 ; Imani *et al.*, 2006). با ترائخت جلوگیری کننده های PCD همزمان حساسیت علیه قارچ های زیوا پرور یا بیوتروف (biotroph) مانند *Blumeria graminis* هم در گیاه جو افزایش می یابد (Imani *et al.*, 2006). برای جلوگیری از این روند می توان با

تراریخت ژن های ضد آپوپتتیک antiapoptotic پیشبر های ویژه ای به دست آورد که آن ها یک زیوا پرور necrophyte یا تراریخت ویژه آلی را فراهم می کنند.

چکیده و دیدگاه آینده

در حدود 15 سال است که توسعه گیاهان مقاوم به قارچ با روش های بیوتکنولوژی دنبال می شود. با کسب موفقیت های اولیه نتایج بعدی نشان داد که تهیه گیاهان مقاوم به قارچ ها که طیف وسیعی داشته باشد هنوز امکان پذیر نیست. ایده های جدید فناوری که دنبال می شود در عمل خیلی پیچیده تر از تهیه گیاهان مقاوم به ویروس ها و حشرات است و زمان بیشتری را لازم دارند. همزمان دانش ما درباره مقاومت گیاهان و مکانیزم بیماری زائی بیمارگر ها بیشتر می شود و در آینده امکانات بهتری برای برنامه ریزی بوجود خواهد آمد.

Literature

- Alexander, D., Goodman, R. M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., Ward, ESCHERICHIA, and Ryals, J., 1993: Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 7327-7331.
- Broglie, K., Chet, I., Hollidat, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C. J., and Broglie, R., 1991: Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254, 1194-1197.
- Cao, H., Li, X., and Dong, X., 1998: Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance *Escherichia* *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (11), 6531-6536.
- de Wit, P. J. G. M., 1992: Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 30, 391-418.
- Dickman, M. B., Park, Y. K., Oltersdorf, T., Li, W., Clemente, T., and French, R., 2001: Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 6957-62.
- Grisson, R., Grezes-Besset, B., Schneider, M., Lucante, N., Olsen, L., Leguay, J. J., and Toppan, A., 1996: Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene *Escherichia* *Nature Biotechnology* 14, 643-646.
- Hain, R., Reif, H.-J., Krause, ESCHERICHIA, Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, ESCHERICHIA, Schreier, H. P., Stöcker, R. H., Stenzel, K.,

- 1993: Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* **361**, 153-156.
- Imani, J., Baltruschat, H., Stein, ESCHERICHIA, Jia, G., Vogelsberg, J., Kogel, K.-H., and Hückelhoven, R., 2006: Expression of barley BAX inhibitor-1 in carrots confers resistance to *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol.* **7**(4), 279-284.
- Jach, G., Görnhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, ESCHERICHIA, Leah, R., Schell, J., and Maas, C., 1995: Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J* **8**, 97-109.
- Joosten, M. H. A. J., and de Wit, P. J. G. M. (1999). The tomato-*Cladosporium fulvum* interaction: A versatile experimental system to study plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**, 335-367.
- Keller, H., Pamboukdjian, N., Ponchet, M., Poupet, A., Delon, R., Verrier, J.-L., Roby, D., and Ricci, P., 1999: Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Escherichia Plant Cell* **11**, 223-235.
- Klages S., Baumeister M., Rohlf, C., Brieß, W., Rushton P., Kirsch C., Heise A., Somssich, I., and D. J. Stahl, 2004: Analysis of PR gene derived pathogen-inducible synthetic promoters in the crop sugar beet. International Joint Workshop on PR-Proteins and Induced Resistance. Escherichia 5-9 May 2004, Elsinore-Denmark.
- Liu, D., Raghothama, K., G., Hasegawa, P. M., and Bressan, R. A., 1994: Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 1888-1892.
- Makandar, R., Essig, J. S., Schapaugh, M. A., Trick H. N., and Shah, J., 2006: Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of *Arabidopsis* NPR1. *Mol Plant Microbe Interact.* **19**(2), 123-129.
- Martini, N., Egen, M., Rüntz, I., and Strittmatter, G., 1993: Promoter sequences of a potato pathogenesis-related gene mediate transcriptional activation selectively upon fungal infection. *Mol Gen Genet* **236**, 179-186.
- Melchers, L. S., and Stuiver, M. H., 2000: Novel genes for disease-resistance breeding. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 147-152.
- Murray, F., Llewellyn, D., McFadden, H., Last, D., Elizabeth, S. D., and Peacock, W. J., 1999: Expression of the *Talaromyces flavus* glucose oxidase gene in cotton and tobacco reduces fungal infection, but is also phytotoxic. *Mol Breed* **5**, 219-232.
- Oldroyd, G. ESCHERICHIA D., and Staskawicz, B. J., 1998: Genetically engineered broad-spectrum disease resistance in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(17), 10300-10305.
- Osusky, M., Osuska, L., Kay, W., and Misra, S., 2005: Genetic modification of potato against microbial diseases: in-vitro and in planta activity of a dermaseptin B1 derivative, MsrA2. *Theor Appl Genet* **111**(4), 711-22.
- Peschen, D., Li H.-P., Fischer, R., Kreuzaler, F., and Liao, Y.-C., 2004: Fusion proteins comprising a Fusarium-specific antibody linked to antifungal peptides protect plants against a fungal pathogen. *Nature Biotech* **22** (6), 732-738
- Rushton P. J., Reinstadler A., Lipka V., Lippok B., Somssich I. ESCHERICHIA, 2002:

- Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell* 14(4), 749-62.
- Song, J., Bradeen, J. M., Naess, S. K., Raasch, J. A., Wielgus, S. M., Haberlach, G. T., Liu, J., Kuang, H., Austin-Phillips, S., Buell, C. B., Helgeson, J. P., and Jiang J., 2003: Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (16), 9128-9133.
- Strittmatter, G., Janssens, J., Opsomer, C., and Botterman, J., 1995: Inhibition of fungal disease development in plants by engineering controlled cell death. *Bio/Technology* 13, 1085-1089.
- Tang X., Xie M., Kim Y.J., Zhou J., Klessig D.F., Martin G.B., 1999: Overexpression of Pto activates defense responses and confers broad resistance. *Escherichia Plant Cell* 11(1), 15-29.
- Terras, F. R., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Osborn, R. W., Kester, A., Rees, S. B., Torrekens, S., Van Leuven, L., and Vanderleyden, J., 1995: Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Escherichia Plant Cell* 7(5), 573-88.
- Thomzik J. ESCHERICHIA, Stenzel K., Stöcker R., Schreier P. H., Hain R., and Stahl D. J., 1997: Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiol Mol Plant Pathol* 51, 265-278.
- Van Loon, L. C., 2001 . The families of pathogenesis-related proteins. 6th International Workshop on PR-Proteins. 20-24 May 2001, Spa, Belgium.
- Wu et al., 1995: Disease resistance by expression of a gene encoding H₂O₂ generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7, 1357-1368.
- Yamamizo, C., Kuchimura, K., Kobayashi, A., Katou, S., Kawakita, K., Jones, J. D. G., Doke, N., and Yoshioka, H., 2006: Rewiring mitogen-activated protein kinase cascade by positive feedback confers potato blight resistance. *Escherichia Plant Physiol* 140, 681-692.
- Yoshikawa, M., Tsuda, M., and Takeuchi, Y., 1993: Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase, from soybean. *Naturwissenschaften* 80, 417-420.
- Zhu, B., Chen, T. H. H., and Li, P. H., 1996: Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein. *Planta* 198, 70-77.
- Zhu, Q., Maher, ESCHERICHIA A., Masoud, S., Dixon, R. A., and Lamb, C. J., 1994: Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Biotechnology* 12, 807-812.

گرایش و زمینه های تحقیقات قارچ کش های مدرن

تیم آنکه و اکارد تینز

Timm Anke & Eckard Thines

Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung IBWF Escherichia V., Erwin-Schrödinger-Strasse 56 ,
67663 Kaiserslautern (timm.anke@ibwf.de)

پیشگفتار

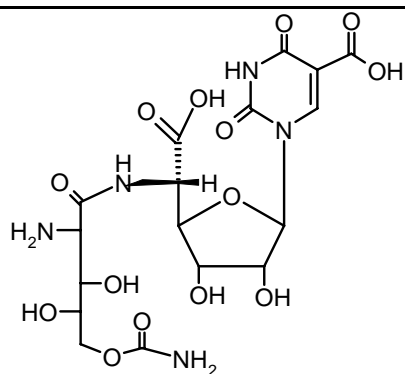
در گذشته بیماری های گیاهی ناشی از قارچ ها و دراروپا سبب کاهش محصول، گرسنگی و موج مهاجرت شدند. لذا به موازات مبارزه با بیماری های انسانی، شیمی درمانی با بیماری های گیاهی هم توسعه یافت. اولین قدم در ساختن قارچ کش صنعتی تیرام (Thiram) بود که براساس ماده مؤثره دی تیوکاربامات (Dithiocarbamat) در سال های 1930 در آمریکا و 1932 در آلمان به بازار آمد. کاربرد سموم شیمیایی و موفقیت های چشم گیر اصلاح نباتات امروزه سبب تأمین غذای بیشماری از انسان ها، نسبت به 80 سال پیش شد. با وجود رسیدن به این موفقیت، تحقیقات قارچ کش ها امروزه در مقابل خواسته های قرارداد که به تأمین غذای سالم جمعیت در حال رشد دنیا ایمنی بیشتری دهد. نظیر همانند شیمی درمانی در پزشکی، در حفظ نباتات هم استفاده از مواد ضد عفونت سبب پیدایش مشکلاتی مانند ایجاد مقاومت در قارچ ها می شود. غیر از آن، عوامل بیماری زای جدیدی، در قسمت های مختلفی از دنیا ظاهر می شوند که قبلا در آنجا وجود نداشتند. مثال زنده آن، پیدایش بیماری زنگ سویا ی نوع آسیائی در آمریکای جنوبی است. در توسعه و تهیه قارچ کش ها، تلاش بیشتری برای ایمنی و تحمل پذیری محیط زیست، هم از طریق راهبردی و هم از طرف مصرف کننده مواد غذایی درخواست می شود. باید توجه کرد که هزینه پیدا کردن یک ماده مؤثر قارچ کش فاصله زیادی با هزینه تهیه یک ماده داروئی ندارد. برای پیدا کردن یک ماده مؤثره که تمام خواسته ها را بر آورد کند، قادر به شکستن مقاومت باشد، همچنین نحوه و مکان اثر گذاری آن مورد دل خواه باشد بسیار مهم است که تاکنون از عهده سموم موجود بازار بر نیامده است. برای این مقصود ساختار مواد جدید شیمیایی و دانش دقیق از متابولیسم قارچ ها مانند زندگی و نحوه عفونت مورد نیاز است. به این دو مورد بیشتر در این بخش پرداخته خواهد شد.

روش های جدید برای مبارزه با قارچ های بیماری زا با ساختار مفید شیمیایی (NCE's)

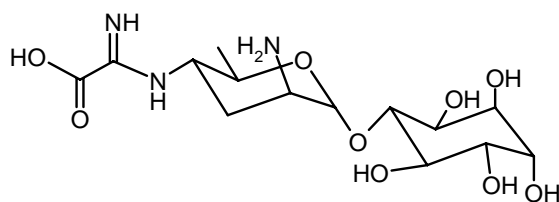
فناوری سنتی : شیمی صنعتی

برای رسیدن به مواد مؤثر جدید دو راه، ساختن صنعتی یا جستجوی ماده جدید طبیعی وجود دارد. زیرا تولید انبوه سموم دفع آفات از نظر هزینه و درجه خلوص اهمیت بیشتری دارد تا ساختن صنعتی آن که تاکنون هد فمند بوده است.

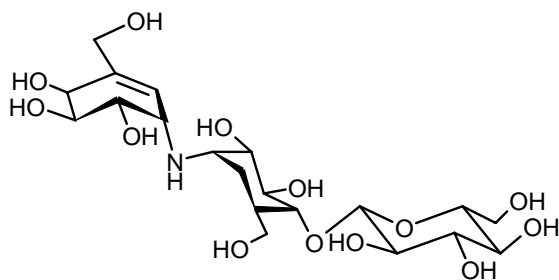
شکل 1 : قارچ کش ها با منشأ طبیعی



Polyoxin D, ein Hemmstoff der Chitinsynthese



Kasugamycin, ein Hemmstoff der Proteinbiosynthese

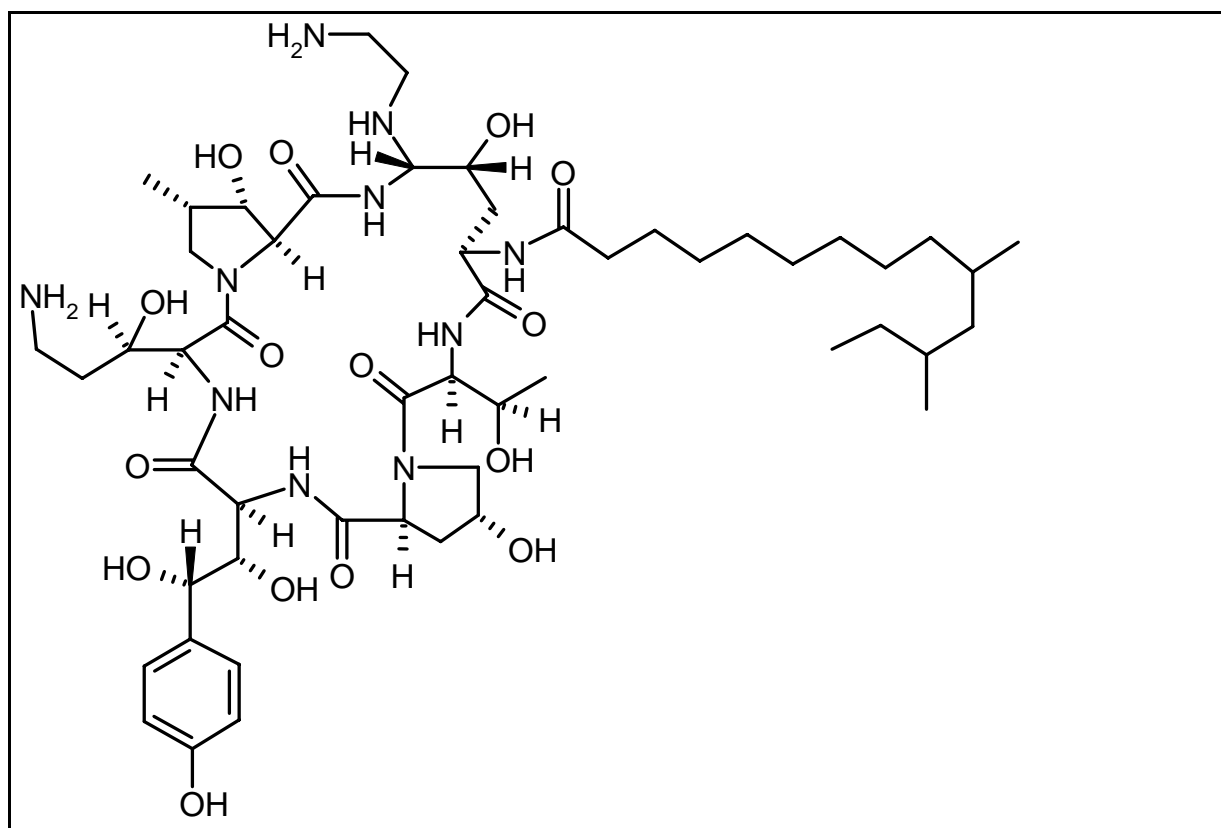


Validamycin A, ein Inhibitor der Trehalase und Inosit-Biosynthese

بیشترین سموم قارچ کش موجود در بازار به صورت مصنوعی ساخته شده اند. از جمله این قارچ کش ها که در سراسر دنیا با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است، آزول (Azole) و سایر ساختارهای آن می باشد که بیوسنتز قارچ های زیادی را مانند ارگوسترین (Ergosterins) مورد حمله قرار می دهد که مهم ترین ماده مورد نیاز قارچ است. در حال حاضر در حدود 60 گروه ماده مؤثره از قارچ کش ها وجود دارد که به 33 مرکز متفاوت متابولیسم قارچ های بیماری زا حمله می کنند (FRAC, 2006). بیشتر آن ها از تولیدات صنعتی با قیمت مناسب تشکیل شده اند و پیچیدگی ساختاری محدودی دارند. ساختن مخلوطی از این مواد برخلاف تصور، موفقیت کمتری داشته است. با توجه به ذخیره داده های تولید، اختلاف محدودی بین آن ها وجود دارد یعنی دارای (hits) یا ساختار جدیدی نیستند.

شکل 2: کاسپوفونگین Caspofungin ، بازدارنده (inhibitor) سنتز گلوکان

(1,3) β -D-Glucansynthase



فناوری زیستی: ساختارهای طبیعی

منابع طبیعی، دارای ساختمان متعدد مولکولی و منابع نامحدودی می باشند. در بین مواد طبیعی سهم ترکیبات فعال بیولوژی بسیار بالا است. فعال بودن بیولوژیکی این مواد به این دلیل است که ساختمان آن

ها (privileged structure) از پروتئین تشکیل شده است و متابولیسم خود را با متابولیسم سلول های زنده هماهنگ می کنند. یعنی در طی گذشت زمان از بین می روند و دائمی نیستند و قابل تحمل برای محیط زیست نیز می باشند. برعکس از نظر سمیت مزیتی ندارند.

بزرگترین مشکل مواد طبیعی هزینه تهیه انبوه آن ها و دسترسی به آن ها است. این موضوع بیشتر در مورد گیاهان نادری صدق می کند که به کندی رشد کرده، یا در دریا زندگی می کنند و یا همراه میکروارگانیزم های دیگر هستند و قابل کشت نمی باشند. در داروسازی با کم کردن هزینه تولید و کاربرد مهندسی ژنتیک، می توان مشکلات را در درازمدت حل کرد. اما از دید دفع آفات، توسعه ساختمان سموم صنعتی راه حل مناسب تری می باشد.

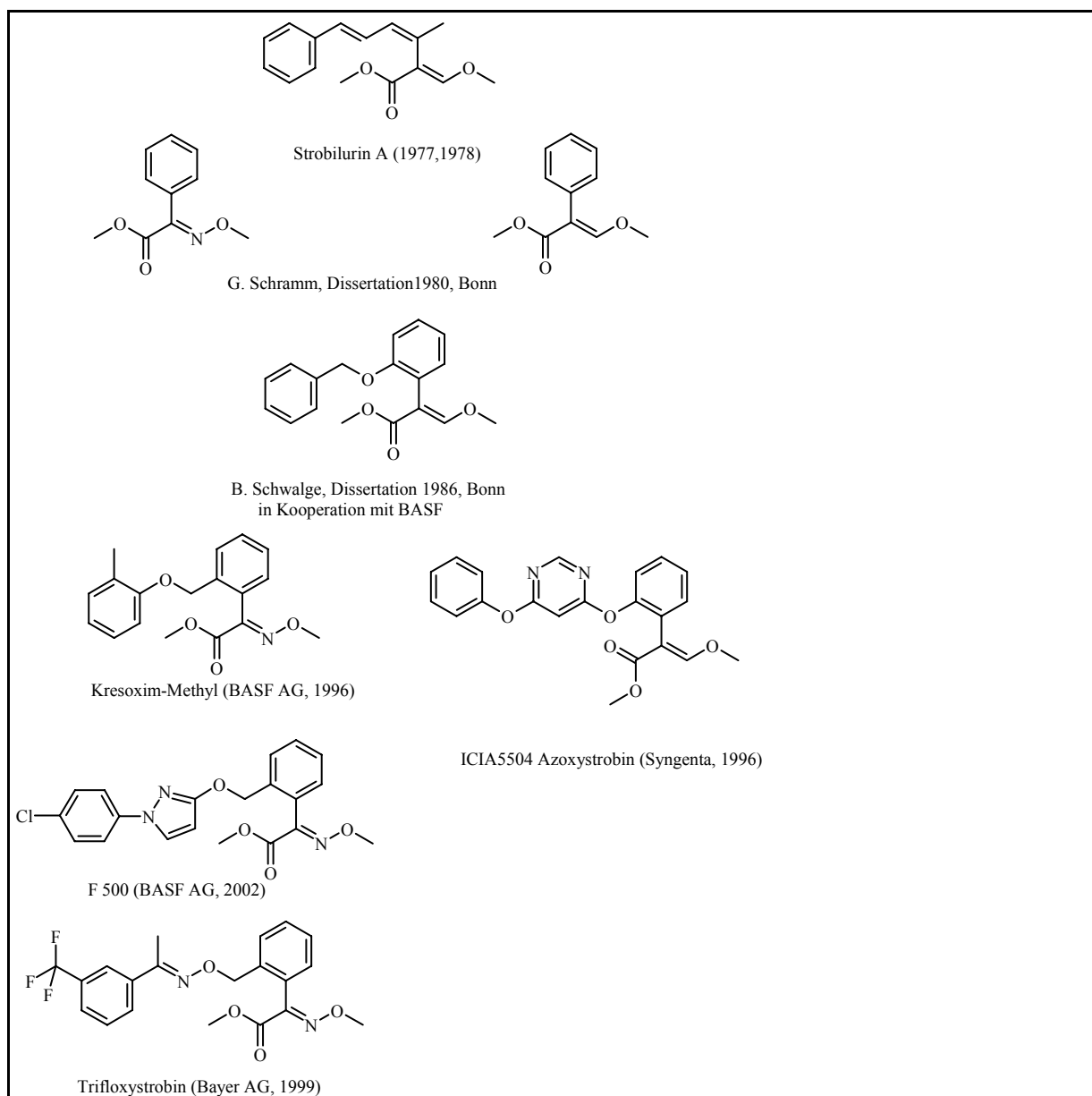
در بازارهای جهان قارچ کش هائی که با تخمیر تهیه شده اند، مانند ولیدامیسین-آ **Validamycin A**، کاسوگامیسین **Kasugamycin** و پلی اکسین دی **Polyoxin D** بسیار کم است (Iwasa *et al.*, 1969; Umezawa *et al.*, 1965; Isono *et al.*, 1970)، (شکل 1). همه این تولیدات از استرپتومیسین ها (*Streptomyces*) تهیه می شوند اما به ندرت مورد استفاده قرار می گیرند. برخلاف قارچ کش های مذکور، حشره کش های آورمکتین (*Avermectine*) و سموم جدید اسپینوسین و اسپینوساد (*Spinosyn/Spinosad*) به صورت انبوه گسترش پیدا کرده اند (Tanaka & Omura, 1993; Sparks *et al.*, 1998).

کاسپوفونگین **Casporfungin**، یک آنتی بیوتیک نیمه صنعتی (شکل 2) و مؤثر با سمیت کمتر از ساختارهای اکینوکاندین (*echinocandin antifungal*) می باشد (Bartizal *et al.*, 1997). این قارچ کش در پزشکی برای درمان آسپرژیلوس های مهاجم (*invasive Aspergillose*) و عفونت های ناشی از قارچ کاندیدا (*Candida-infection*) بسیار مؤثر و دارای سمیت جانبی بسیار کم است و می تواند جایگزین قارچ کش آمفوتریسین - بی (*Amphotericin-B*) که بسیار سمی است شود. محل اثرگذاری سنتز گلوگان $(1,3)\beta\text{-D-Glucansynthase}$ هم می تواند برای قارچ های بیماری زا بسیار جالب باشد ولی از نظر ساختار با اکینوکاندین ها متفاوت است و از ایجاد مقاومت ناشی از تلفیح قارچ جلوگیری می کند.

در حفظ نباتات، مواد طبیعی می تواند برای شیمی صنعتی ایده رسان باشد و هم زمان شناسائی محل اثرگذاری قارچ کش ها را تعیین کند. به عنوان مثال استروبیلورین (**Strobilurine**) یکی از موفق ترین قارچ کش های کشاورزی است که از بازیدومیسیت جداسازی شده است (Sauter *et al.*, 1999). استروبیلورین و اودومانسین (**Oudemansin**) در رفتار و بستره (**Substrate**) محیط یا ماده ای که میکروارگانیزم در درون یا روی آن تغذیه و رشد کند - مترجم مدافع خودش است. در حال حاضر تولید آن ها از طرف شرکت های رقیب هم افزایش یافته است (Kettering *et al.*, 2004). محل

اثرگذاری این سموم در سیستم زنجیره تنفسی است. اولین ساخت صنعتی این قارچ کش و پیدا کردن توکسوفور (Toxophors) آن، شرکت های صنعتی را تشویق به همکاری کرد و یک رقابت بین المللی را بوجود آورد به نحوی که اولین تولید آن در سال 1996 به بازار آمد (شکل 3). قارچ کش استروبیلورین با منشأ طبیعی و حفظ مزایای اکولوژی، تولید کنندگان را بسیار تحت تأثیر قرار داده، به نحوی که آن را برای مصرف در حفظ نباتات بهینه سازی کرده اند.

شکل 3 : راه طولانی ماده طبیعی استروبیلورین (Strobilurin A) تا کاربرد قارچ کشی آن در جهان



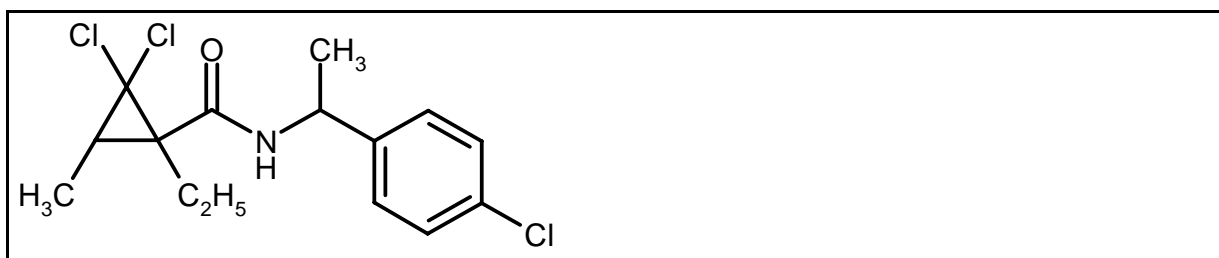
اختلاف نحوه عفونت قارچ های بیماری زا و حمله به این نقاط با قارچ کش های مدرن

قارچ کش هائی که قارچ ها را در مرحله افتراق مورد حمله قرار داده و یا از تفکیک شکل گیری قارچ جلوگیری می کنند و مانع رسیدن به مرحله عفونت را می شوند از دوناظر مورد درخواست کشاورزی است اولاً قارچ های بیماری زا را از بین برده و در ضمن تأثیری بر میکوریزا یا قارچ های همزیست محیط گیاه ندارند. در طول فرگشت تکامل (Evolution)، قارچ های بیماری زا، راه های متفاوتی را پیدا کرده اند تا در گیاهان تولید عفونت کنند. راه های نفوذ قارچ به میزبان می تواند از راه کوتیکول با کمک آنزیم یا با نیروی مکانیکی، از راه زخم و یا روزنه ها باشد.

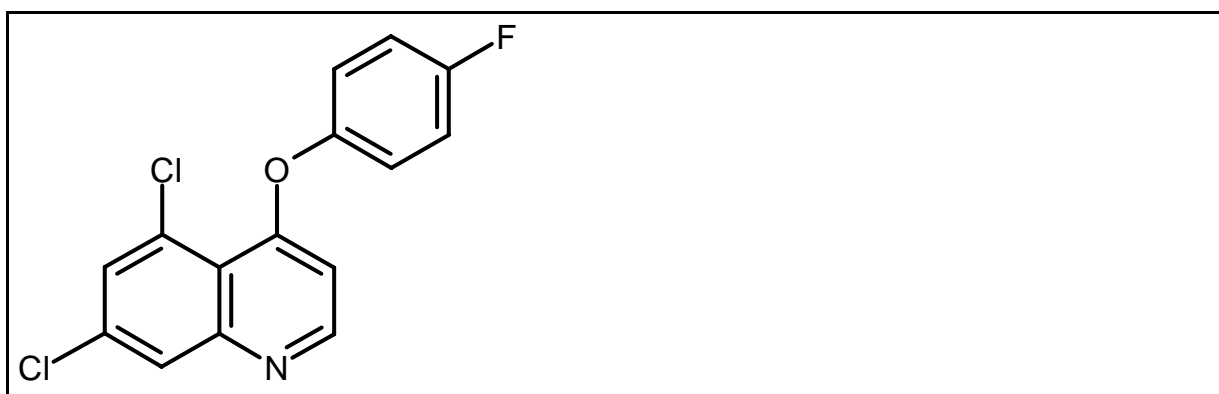
تندش کنیدی ها، تغییر شکل در انتهای لوله تندش و تشکیل اعضای نفوذی از شرایط موفقیت ایجاد عفونت یک قارچ و مستقر شدن در یک میزبان است. ماده مؤثره ای که از این مراحل جلوگیری کند، می تواند از جنبه حفظ نباتات مورد توجه قرار گیرد (Thines et al., 2004). به علت راهبرد های متفاوت عفونت، و تندش کنیدی، که اولین قدم افتراق قارچ می باشد و تندش آن در سطح برگ در اغلب بیمارگر های هوازی عادی است، جلوگیری از این تندش هدف کاربردی در بیشتر قارچ کش ها می باشد. به صورت مثال، بیوسنتز ملانین (Melanin biosyntheses) که یک سم دفع آفات و سمیت قارچ کشی است علیه بیماری سفیدک برنج *Magnaporthe grisea* به کار می رود و از افتراق (differentiations) و نفوذ قارچ جلوگیری می کند. سنتز دی هیدروکسیل نفتالین - ملانین (Dihydroxynaphthalin-Melanin = DHN-Melanin) و تمرکز ضمایم پلی مرهای آن در دیواره سلولی چنگک قارچ یا آپروسوریوم (appressorium) شرایط ویژه ساختار عفونت است (Howard, 1997). در موتانت هائی که از بیوسنتز دی هیدروکسیل نفتالین آن ها جلوگیری می شود، چنگک قارچ نمی تواند تورم رشدی داشته باشد. در این صورت کوتیکول برگ های برنج قابل نفوذ چنگک نیست و عفونتی هم به وقوع نمی پیوندد (Howard & Valent, 1996). بر طبق این اصل مواد جلوگیری کننده از سنتز دی هیدروکسیل نفتالین با موفقیت در طول 30 سال گذشته در برنجکاری ها مورد استفاده قرار گرفته اند. سموم قدیمی مانند تری زیکلزول (Trizyklazol) که آنزیم کلیدی تترا (tetra) یا تری (tri) هیدروکسیل نفتالین رداکتاز (hydroxynaphthlinreductase) است بیوسنتز ملانین را در قارچ *Magnaporthe grisea* متوقف می کند. این قارچ کش با قارچ کش جدید کارپروپامید (Carpropamid) که به تازگی تهیه شده است در نحوه اثرگذاری تفاوت دارد. قارچ کش کارپروپامید واکنش های سنتز را متوقف می کند یعنی از تبدیل (Scytalon) به (1,3,8-Dihydroxynaphthalin) جلوگیری می کند (Thieron et al., 1998). جلوگیری از (inhibitor) بیوسنتز ملانین DHN-Melanin

بیشتر در عملکرد چنگک قارچ اثر می‌گذارد اما در رشد میسلیم تأثیری ندارد. یکی از معایب این ترکیب محدود بودن طیف آن به قارچ‌ها می‌باشد. زیرا تعداد قارچ‌هایی که مستقیماً از کوتیکول نفوذ می‌کنند، کم است. جلوگیری بیوسنتز ملانین DHN-Melanin در مبارزه با قارچ *Magnaporthe grisea* بعنوان پیش‌گیرنده مصرف می‌شود.

شکل 4: کارپروپامید Carpropamid یک سم جلوگیری بیوسنتز ملانین (DHN-Melanin biosyntheses) در مبارزه با قارچ بلاست برنج *Magnaporthe grisea*



شکل 5: کین اکسیفن Quinoxifen قارچ‌کشی که از تشکیل چنگک قارچ یا آپروسوریوم (*Blumeria graminis*) در قارچ سفیدک سطحی گندم جلوگیری می‌کند



کین اکسیفن (Quinoxifen) از گروه شیمیایی فنواکسی کیونولین (Phenoxyquinoline)، مثال دیگری از قارچ‌کش‌هایی است که از مرحله تفکیک شکل‌گیری قارچ یعنی در مرحله تشکیل چنگک قارچ *Blumeria graminis* عامل بیماری سفیدک گندم جلوگیری می‌کند. محل اثرگذاری دقیق مولکولی کین اکسیفن در قارچ کاملاً مشخص نشده است. زیرا ترکیبات کین اکسیفن هیچ‌گونه سمیت در میسلیم‌های قارچ‌ها به جا نمی‌گذارد. گمان می‌رود اثر آن در ترانس‌سیگنال (signal transduction) اولیه است که مانع از تشکیل چنگک قارچ و سایر ارگان‌های آن می‌شود (Wheeler)

(et al., 2000). آزمایش های بعدی نشان داد مقدار نسخه برداری (transcription) پروتئین کیناز-سی (Kinas-C) و پروتئین cAMP مربوط به کیناز-سی، گسترش کین اکسین را تغییر می دهد اما هنوز مشخص نشده است که فعالیت آنزیمی کیناز مستقیماً تحت تأثیر قرار می گیرد (Wheeler et al., 2003). تعیین نحوه اثرگذاری در موتانت های مقاوم مشکل بود، زیرا موتانت های مقاوم قارچ، اسپرهای کمتری تولید می کنند و عمر آن ها کم است.

تعدیل کننده های ترانساسی در قارچ ها با نقش قارچ کشی

غیراز کین اکسین، قارچ کش های دیگری هم وجود دارند که با توسعه و پیشرفت سیگنال در فضای بین سلولی در قارچ های بیماری زا جذب می شوند. برخلاف مواد جلوگیری کننده، فرآیند سیگنال فلودی اکسنول (Fludioxonil) سبب افزایش بیش از حد راه های سیگنال کیناز (MAP Kinase) در قارچ می شود (Kojima et al., 2004). فلودی اکسنول یک قارچ کش فنیل پیرول (Phenylpyrrol) است که ساختار آن از پیرول نیترو (Pyrrolnitrin) طبیعی گرفته شده است (Gehmann et al., 1990). قارچ کش فلودی اکسنول به علت داشتن طیف وسیع قارچ کشی علیه بیماری های قارچی گیاهان مهم اقتصادی به کار برده می شود.

شکل 6 : فلودی اکسنول Fludioxonil قارچ کشی که سبب هدایت سیگنال در قارچ ها می شود



بررسی اثر این قارچ کش در موتانت های مقاوم نشان داد که به عنوان مثال قارچ بوتریتس *Botrytis cinerea* در موتانت مقاوم نسبت به نمونه وحشی حساس تر به استرس (stress) اسمزی شده است (Yoshimi et al., 2003; Kojima et al., 2004). در قارچ های ساکارومیست مانند *Saccharomyces cerevisiae* کیناز ام-آپی Hog1 یک عامل اساسی در تنظیم واکنش سلولی به استرس اسمزی می باشد (Brewster et al., 1993). در مورد قارچ های مفتولی شکل مانند *Neurospora crassa* و *Colletotrichum lagenarium* موتانت قارچ هائی که در آن ها ژن

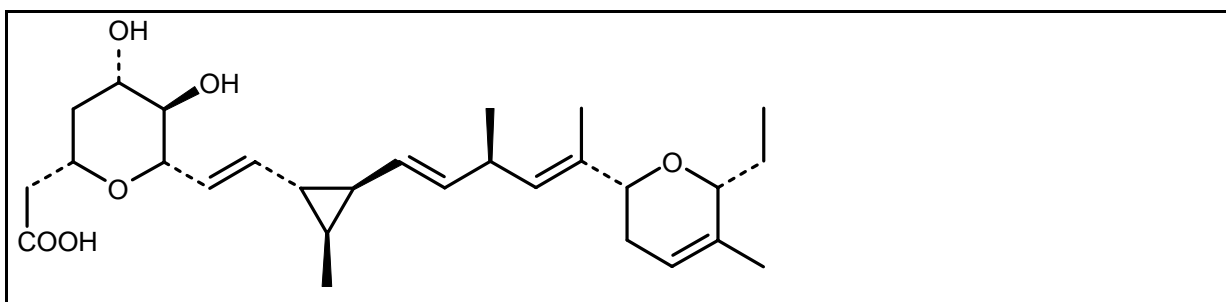
های خودی (HOG1) حذف شده بود، حساسیت اسمزی و مقاومت علیه قارچ کش فلودی اکسنول بوجود می آید (Zhang *et al.*, 2002 ; Kojima *et al.*, 2004).
 بعد از استعمال قارچ کش فلودی اکسنول علیه *Colletotrichum lagenarium* یک Hog1 مرتبط با کیناز (MAP Kinas) فسفوره شده و بدین وسیله فعال می شود. لذا تصویری می شود که فعال شدن Hog1 کیناز (MAP Kinas) مسئول اثرگذاری قارچ کش فلودی اکسنول است (Kojima *et al.*, 2004).

شکل 7 : پیروول نیتروین Pyrrolnitrin



در قارچ کش پیروول نیتروین هم تنظیم اسمز قارچ ها از نحوه اثرگذاری آن می باشد که به عنوان مثال می توان به اثر فرآورده ضد قارچی در باکتری *Pseudomonas sp.* اشاره کرد (Pillonel & Meyer, 1997). ماده مؤثره این قارچ کش از کیناز پروتئین در ترانس سانی سیگنال جلوگیری می کند که پاسخ سلول به دخالت استرس نمک می باشد.

شکل 8 : آمبروتیسین - اس Ambruticin S



دلیل دیگر دخالت در سیستم تنظیم اسمزی به وسیله قارچ کش های فنیل پیروول (Phenylpyrrol) و دی کاربوکسیمید (Dicarboximid) از نتیجه بررسی های بیولوژی مولکولی قارچ بیماری زای ذرت *Cochliobolus heterostrophus* به دست می آید. در موتانت های این قارچ نسبت به نمونه

های وحشی که در آن ها کیناز هیستیدین (Histidin Kinase III. group) وجود ندارد کمتر به قارچ کش حساس هستند. گمان می رود گروه سه کیناز هیستیدین در فعال کردن Hog1 که مرتبط با سیگنال کیناز- ام - ای - پی (MAP Kinase)، سهم می باشند (Yoshimi et al., 2005). در قارچ بیماری زای انسانی *Cryptococcus neoformans* توانستند ثابت کنند که سه عامل ترانسان سیگنالی در حساس شدن این قارچ در مقابل قارچ کش فلودی اکسنول سهم هستند. غیر از راه سیگنال (MAP Kinase) مربوط به Hog1، توانستند سیگنال Calcineurine و Mpk1 را هم شناسایی کنند که سبب مقاومت قارچ در مقابل قارچ کش می شوند.

با وجود این که نحوه اثرگذاری قارچ کش فنیل پیرول کاملاً معلوم نیست احتمال می رود ترانسان سیگنال در سیستم تنظیم اسمزی سهم باشد و این ایده مناسبی برای تهیه و توسعه قارچ کش های جدید است.

تصور می شود این نوع اثرگذاری هم در مورد ماده طبیعی آمبروتیسین **Ambruticin** صادق است، که از تولیدات فرآورده ثانوی کشت میکومیست ها مانند *Polyangium cellulorum* به دست می آید (Knauth & Reichenbach, 2000). انواع مقاوم به پیرول نیتروژن هم در مقابل امبروتیسین کمتر حساس هستند. از اثرات دیگر قارچ کش ها با منشأ طبیعی در قارچ *Zygosacchomyces rouxii* غیر از تمرکز گلیسرین، تغییراتی هم در ساختمان لیپید ها داده می شود. اثر نهایی آمبروتیسین شاید مربوط به این تغییرات چربی باشد (Knauth & Reichenbach, 2000).

راهبرد های جدید دریافتن قارچ کش های تازه

یکی از معایب قارچ کش های که از افتراق یا تفکیک قارچ جلوگیری می کنند مورد مصرف کمتر آن ها است. برای شناسایی نقاط جدید اثرگذاری سموم که در بیشتر قارچ ها مؤثر باشد، تحقیقات دانشمندان ژنتیک اهمیت بیشتری پیدا می کند. در حال حاضر توالی ژنوم خیلی از قارچ ها بررسی می شود. نتیجه این تحقیقات در باکتریا نگرانی، و امکان می دهد که خواص ژن ها و نحوه اثرگذاری قارچ کش ها بهتر با هم مقایسه شوند (Xu et al., 2006). مخصوصاً بررسی نقشه صفات ژن ها کمک شایان به شناسایی تولیدات ژن ها می کند و سبب می شوند فرآیند عفونی یا واکنش فیزیولوژیکی قبل از شروع عفونت شناسایی شوند (Beffa, 2004). نسخه برداری ژن های شناسایی شده نشان داد که پروتئین ها در چنین فرآیندی نقش اساسی دارند.

اطلاعات معنی دار بدست آمده از توالی ژن ها ی شناخته شده در درجه اول به خاطر این است که پروتئین ها در فرآیند فعال این ژن ها نقش اساسی دارند. همچنین اطلاعات بدست آمده از توالی ژن ها برای دست کاری ساختار مولکولی مانند

حذف ژن ها، ساده کردن ژن ها که اساس فهمیدن چرخه سنتز زیستی، تفکیک و شناسایی سیگنال است را فراهم می کنند. از بین بردن ژن ها معایب بسیار زیادی در پی دارد. اغلب از بین بردن ژن ها سبب از بین رفتن اثرات چندگانه آن ها (pleiotrop) می شود. یعنی تغییرات موتانت ها می توانند از اثرات جنبی و ثانوی باشند و استفاده از مشاهدات جنبی در داوری ژن ها و پروتئین های مورد بررسی مجاز نیست.

اگر فنوتیپ غیر بیماری زایی در یک موتانت تشخیص داده شود این تحلیل را نمی دهد که تولیدات ژن با فاکتورهای بیماری زایی همان مکان اثرگذاری قارچ کش است. خود اثرات ژن در مبارزه بسیار مهم هستند. با نسخه برداری ثانوی (PTGS) **gene silencing** می توان این مرحله را پی گیری کرد و در آن ریبونکئیک اسید mRNA ویژه توالی ژن را حذف کرد (Nakayashiki *et al.*, 2005). مخصوصاً فاکتورهای که تصویری رود در نهایت سبب از بین بردن ژن های فنوتیپ می شوند، در این صورت PTGS نقش فیزیولوژیکی مهمی را بعهده می گیرد. برای تشخیص و فعال کردن فاکتورهای نامرئی (target) در تهیه سموم دفع آفات می توان از مواد جلوگیری کننده ها (inhibitors) هم استفاده کرد. مزیت استفاده از جلوگیری کننده ها در این است که آن ها را می توان با غلظت های متفاوت و در زمان های متفاوت به کاربرد. از طرفی مواد طبیعی بخاطر ساختار شیمیائی متنوع بسیار مورد توجه است. در گذشته لیست مواد شیمیایی بیشتر از نظر امکان آمار برداری و فعالیت بیولوژیکی آن ها مورد بررسی قرار می گرفت، امروزه این بررسی ها بر اساس ویژگی های بیولوژیکی مانند ترانسائی سیگنال یا اثرات افتراق اجرا می شوند. روی این اصل انتظاری رود در آینده اثرات متابولیسم این روش ها بیشتر مورد استفاده حفظ نباتات قرار گیرند.

Literature

- Bartizal, K., Gill, C. J., Abruzzo, G. K., Flattery, A. M., Kong, L., Scott, P. M., Smith, J. G., Leighton, C. ESCHERICHIA, Bouffard, A., Dropinski, J. F., Balkovec, J., 1997: In vitro preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob. Agents Chemother* **41**, 2326-2332.
- Beffa, R., 2004: Genomics and biochemistry in the discovery process of modern fungicides. *Bayer Pflanzenschutz Nachrichten* **57**, 46-61.
- Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, ESCHERICHIA, Gustin, M.C., 1993: An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**, 1760-1763.
- FRAC, Fungicide Resistance Action Committee (<http://www.frac.info/frac/index.htm>), 2006.
- Gehmann, K., Nyfeler, R., Leadbeater, A. J., Nevill, D., Sozzi, D., 1990: CGA 173506: a new phenylpyrrole fungicide for broad-spectrum disease control. Brighton Crop

- Prot Conf Pests Dis 2, 399–406.
- Howard, R.J., Valent, B., 1996: Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Ann Review Microbiology* 50, 491-512.
- Howard, R.J., 1997: Breaching the outer barriers – cuticle and cell wall penetration. In *The Mycota 5A: Plant Relationships* (G. C. Carroll & P. Tudzynski, eds). Springer-Verlag: Berlin, pp. 43-60.
- Isono, K., Asahi, K., Suzuki, S., 1969: Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. 13. The structure of polyoxins. *J Am Chem Soc* 91, 7490-7505.
- Iwasa, T., Hagashide, ESCHERICHIA, Shibata, M., 1970: Studies on validamycins, new antibiotics. I. *Streptomyces hygrosopicus* var. *limoneus* nov. var., validamycin-producing organism. *Jpn J Antibiot* 6, 595-602.
- Kettering, M., Sterner, O., Anke, T., 2004: Antibiotics in the chemical communication of fungi. *Z Naturforsch* 59c, 816-823.
- Knauth, P., Reichenbach, H., 2000: On the mechanism of action of the myxobacterial fungicide ambruticin. *J Antibiot* 53(10), 1182-90.
- Kojima, K., Bahn, Y.-S., Heitman, J., 2006: Calcineurin, Mpk1 and Hog1 MAPK pathways independently control fludioxonil antifungal sensitivity in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 152, 591-604.
- Kojima, K., Takano, Y., Yoshimi, A., Tanaka, C., Kikuchi, T., Okuno, T., 2004: Fungicide activity through activation of a fungal signaling pathway. *Mol Microbiol* 53, 1785–1796.
- Nakayashiki H., Hanada S., Nguyen B.Q., Kadotani N., Tosa, Y., Mayama, S., 2005: RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genet Biol* 42(4), 275-83.
- Pillonel, C., Meyer, T., 1997: Effect of phenylpyrroles on glycerol accumulation and protein kinase activity of *Neurospora crassa*. *Pestic Sci* 49, 229-236.
- Sauter, H., Steglich, W., Anke, T., 1999: Strobilurine: Evolution einer neuen WirkstoffklassEscherichia *Angew Chem* 111, 1416-1438; *Int. Ed.*, 39, 1328-1349.
- Sparks, T.C., Thompson, G.D., Kirst, H.A., Hertlein, M.B., Mynderse, J.S., Turner, J.R., Worden, T.V., 1998: Fermentation-Derived Insect Control Agents The Spinosyns. In: F. R. Hall and J. J. Menn (eds) *Methods in Biotechnology, Biopesticides: Use and Delivery*, Humana Press, Totowa, NJ, 5, 171-188.
- Tanaka, Y., Omura, S., 1993: Agroactive compounds of microbial origin. *Ann Review Microbiology* 47, 57-87.
- Thieron, M., Pontzen, R., Kurahashi, Y., 1998: Carpropamid: a rice fungicide with two modes of action. *Bayer Pflanzenschutz Nachrichten* 51, 257-277.
- Thines, ESCHERICHIA, Anke, H., Weber, R.W.S., 2004: Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection-related morphogenesis in phytopathogenic fungi. *Mycol Res* 108, 14-25.
- Umezawa, H., Hamada, M., Suhara, Y., Hashimoto, T., Ikekawa, T., 1965: Kasugamycin, a new antibiotic. *Antimicrobial Agents Chemother* 5, 753-757.
- Wheeler, I., Hollomon, D.W., Longhurst, C., Green, ESCHERICHIA, 2000: Quinoxifen signals a stop infection by powdery mildews In: *The BCPC Conference – Pests & Disease*, Abstract 8A-4.
- Wheeler, I.ESCHERICHIA, Hollomon, D.W., Gustafson, G., Mitchell, J.C., Longhurst, C., Zhang, Z.G., Gurr, S.J., 2003: Quinoxifen perturbs signal transduction in barley

- powdery mildew (*Blumeria graminis f.sp hordei*) Mol Plant Pathol 4, 177-186.
- Xu, J.R., Peng, Y.L., Dickman, M.B., Sharon, A., 2006: The dawn of fungal pathogen genomics. Annual Review of Phytopathology, Epub (ahead of print).
- Yoshimi, A., Kojima, K., Takano, Y., Tanaka, C., 2005: Group III histidine kinase is a positive regulator of Hog1-type mitogen-activated protein kinase in filamentous fungi. Eukaryot Cell 4(11), 1820-1828.
- Yoshimi, A., Imanishi, J., Gafur, A., Tanaka, C., Tsuda, M., 2003: Characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Cochliobolus heterostrophus* resistant to dicarboximide and phenylpyrrole fungicides. J Gen Plant Pathol 69, 101–108.
- Zhang, Y., Lamm, R., Pillonel, C., Lam, S., Xu, J.-R., 2002: Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa* os-2 gene encodes a Hog1 mitogen-activated protein kinase homologue. Escherichia Appl Environ Microbiol 68, 532–538.

Petr Karlovsky

Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abt. Molekulare Phytopathologie & Mykotoxinforschung, Georg-August-Universität, Grisebachstrasse 6, 37077 Göttingen (pkarlov@gwdg.de)

آنالیز فنآوری زیستی : واکنش رسانه های جمعی و مراجع رسمی و چالش های ناشی از آن ها

راه کارهای آنالیز مدرن در کشاورزی و فنآوری مواد غذایی در دو رشته با هم تلاقی می کنند. در رشته اول توانایی های دی-ان-ای (DNA)، آنالیز پروتئین، تشخیص مولکولی، نشان یا تارگت های ژن و تولیدات ژنی قسمتی یا تمام یک میکروارگانیزم را اثبات و یا تعیین کیفیت می کند. وجود آن ها را مانند تعیین تغییرات وراثتی گیاه و تولیدات کشاورزی با راه کارهای بیوتکنولوژی تعیین یا بر آن تأثیر می گذارد. در رشته دوم کارشناسان تجزیه، تشخیص های بیوتکنولوژی را در تهیه ی آنزیم های بیولوژی نظیر پلی مرهای DNA در آزمایش های واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) و تهیه پادتن یا آنتی بادی در سنجش سرولوژیک الایزا به کار می برند.

از طرف دیگر از بهینه سازی آنالیز و نظارت به راه کارهای بیوتکنولوژی نمی توان چشم پوشی کرد. در خیلی از موارد نمی توان بین تشخیص و آنالیز بیوتکنولوژی تفاوتی قائل شد. اصطلاح هائی مثل راه کارهای تشخیص بیوتکنولوژی و آنالیز بیوتکنولوژی اغلب برعکس یکدیگر هستند (Hensley & Myszka, 2000).

راه کارهای آنالیز و بیوتکنولوژی، صفات را به هم ارتباط می دهند. بدین صورت که نتایج تحقیقات پایه ای را در فاصله کوتاه و با حداقل تأخیر دریافت و به کار می برند. اقدامات آنالیز و بیوتکنولوژی در عرصه خود و نه دیرتر، به سرعت توسعه پیدا می کند و از طرف جامعه، رسانه های گروهی و سیاستمداران، بیشتر از سایر فنآوری ها جدی گرفته می شوند. رسانه های گروهی در عرضه و ارائه نتایج رشته های آنالیز و بیوتکنولوژی، دونقش مختلف دارند. به خود بیوتکنولوژی با تردید نگاه می کنند، اگر همزمان مورد انتقاد یا پیش داوری قبلی قرار نگرفته باشد. اقدامات آنالیز و بیوتکنولوژی اهل فن را تحریک و مردم غیرفنی را وادار به بحث در مزایا و معایب آینده خود می کند. گروه های اجتماعی، از اتحادیه های غیر حرفه ای گرفته تا مذهب و کلیسا خود را در موقعیتی می بیند که درباره

اثرات بعدی و احتمالی ارگانسیم های تغییرژن داده در آینده محیط زیست، درزمینه های بهداشتی اظهار عقیده کرده و از ارقام گیاهان تغییرژن داده فاصله بگیرند و درپس زنی این مسائل جبهه بندی کنند و راه کارهای آنالیز و تشخیص را بی ارزش جلوه دهند. نتیجه این گونه برخورد ها، شایعه پراکنی و انتشار نادرست مطالب درباره عواقب کاربردی آن است و به ندرت درمورد عدم وجود این فناوری های ویژه صحبت می شود. داده های بیوتکنولوژی و آنالیز آن ها راسا مورد اعتماد هستند، اما امری که مورد توجه رسانه های همگانی قرار نمی گیرد، تفسیر نتایج آن، توقعات مختلف درسم شناسی می شود، تثبیت و پایداری، چگونگی واکنش محیط زیست و سایر صفات مواد تهیه شده و تولیدات ژنی و ارگانیزم ها هستند. انتشارات نتایج مثبت را رسانه های همگانی خارج از سطح انتشارات رسانه های همگانی می دانند. با اعلام داده های آنالیز نادرست، مواردی که وجود خارجی ندارد مردم را فریب می دهد. به صورت مثال اعلام می کنند اجازه کاشت گیاهان تغییرژن یا تراریخته صادر شده و ممکن است به صورت ناخواسته ژن های تراریخته با گرده افشانی یا انتشار افقی در مزرعه خطرناک باشند. این نوع اظهار نظر ها نه تنها در رسانه های همگانی مطرح می شود بلکه به توسط افراد متخصص هم که مایل هستند در جامعه بیشتر مطرح شوند، نیز منتشر می شود. اگر برای آزمایش ارقام تراریخته، مزرعه ای در فاصله مشخصی در کنار مزرعه گیاهان سنتی قرار گیرد، فوراً نتایج آن را به صورت خطر بالقوه تفسیر و ارزشیابی می کنند. اما در این انتشارات مطرح نمی شود که، ژن گیاهان مقاوم به علف کش ها به چه امری خطرناک است، به حفظ نباتات و محیط زیست یا این که به شرکت های تولید کننده سموم کشاورزی که منافع فروش آن ها به خطر می افتد. پیش دآوری و کلیات گوئی درمورد نتایج به دست آمده از بیوتکنولوژی، منظر و دید سیاست رسانه های جمعی ما شده است و پایانی هم ندارد. این پیش دآوری ها به دلیل کمبود درک فنی و تفسیر غلط از نتایج تجزیه و تحلیل داده های آنالیز شیمی، از کارهای معمولی و مستمر رسانه های همگانی است.

اسپکترومتر انبوه سنج یک نوآوری مهم در آنالیز شیمی

سه نوآوری تکنولوژی در آنالیز (Analytical Biotechnology) و تشخیص مواد شیمیایی در ده سال گذشته بوجود آمده است. اولین نوآوری توسعه انبوه سنج اسپکترومتر (Chromatography-mass Spectrometry) است که به صورت استاندارد در آنالیزها به کار برده می شود. دومین نوآوری تجزیه با فناوری کرماتوگرافی قوی مایع (HPLC) Liquid High-Performance Chromatography و اندازه گیری جریان نانو (Nano stream) بود که در اولین تولید تجارتي

(HPLC-chip) Agilent Technology و (Brio cartridge) به بازار آمد. این روش از یک سیستم آنالیز ظریف جداسازی تشکیل شده است. زیرا این وسایل، کمتر در بررسی های روزمره کاربرد دارند و استفاده از آن ها به حد نصاب قابل لمسی نرسیده است، لذا به صورت مختصر به آن اشاره خواهیم کرد. سومین نوآوری به علت کاربرد مؤثرش دگرگونی عظیمی را بوجود آورد. لذا به همین نام یعنی انقلابی نامیده شده است. اساس آن بر واکنش زنجیری پلی مرآز (PCR) polymerase chain reaction ساخته شده است. در این روش اثبات قطعات توالی (sequence) ویژه اسید نوکلئیک بررسی یا کیفیت آن تعیین می شود. کاربرد این نوآوری، با آوردن مثالی از قارچ هائی که زهرابه (میکوتوکسین) درست می کنند، شرح داده خواهد شد.

شکل 1: کرماتوگرافی قوی مایع (HPLC) Liquid High-Performance Chromatography در بخش بیولوژی مولکولی و تحقیقات قارچ زهر Mycotoxine دانشگاه گوتینگن (عکس از Petr Karlovsky)



کرماتوگرافی قوی مایع (HPLC) یک پیشرفت مهم می باشد. این وسایل به عنوان کرماتوگرافی از دهه 1960 شناخته شده و در طول 20 سال گذشته به صورت فشرده توسعه یافته است (Vestal, 1984). از 5 سال گذشته این فناوری متمرکزتر و استفاده از آن ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از این وسایل نه تنها برای کارشناسان فنی آسان است، بلکه استفاده از آن به وسیله نیروی انسانی کارآموده و تکنیسین ها در صنایع و واحد های تجاری به راحتی امکان پذیر است.

در اوایل اسپکترومتر گازی (GC-MS) از تجهیزات اصلی آزمایشگاهها بود ولی امروزه و به تدریج اسپکترومتر قوی مایعات (HPLC-MS) جایگزین آن در تجهیزات اصلی و اولیه آزمایشگاه ها شده است (Careri, Mangia, & Musci, 1996). در بیشتر تجزیه ها، مواد مورد تجزیه ابتدا یونیزه می شوند و سپس با اسپکترومتر آن مواد ردیابی، شناسائی و کمیّت آن ها تعیین می گردد.

با استفاده از رد یاب (Detector) پیشرفته اسپکترومتر انبوه سنج، تجزیه و آنالیز به صورت یک روال آزمایشی در کارهای روزمره برای تعیین نشان های (target) جدید در محصولات کشاورزی و مواد غذایی در آمده است. قدرت انتخابی (selectivity) زیاد اسپکترومتر انبوه سنج (mass Spectrometry) و امکان یونیزه شدن بالای مواد مورد تجزیه، امکان تعیین کمیّت آن ها را در طول انجام یک آزمایش فراهم می کند. استفاده از وسایل کروماتوگرافی گازی (GC-MS) در عمل زودتر از کروماتوگرافی مایع (HPLC) برای کارهای آزمایشگاهی تکمیل شده است. زیرا گاز را می توان به صورت فاز متحرک یا mobile، مستقیماً برای یونیزاسیون در منبع یون آورد در حالی که در دستگاه کروماتوگرافی مایع (HPLC) فاز متحرک مایع باید به صورت فازگازی تبدیل شود. در این بین وسایل کروماتوگرافی مایع نسبت به کروماتوگرافی گازی پیشی گرفته است و احتمالاً به این صورت هم باقی می ماند.

برخلاف کروماتوگرافی گازی، کروماتوگرافی مایع نیازی به مشتقات (derivate) موادی که قابل تبخیر نیستند، ندارد. این وسایل برای موادی که در مقابل حرارت بی ثبات هستند بسیار مناسب است و اطلاعات مهم ماکرومولکول ها را هم به دست می آورد (مانند پروتئین و فراگمنت های دی - ان - ای) که برای کروماتوگرافی گازی به صورت اصولی نامناسب می باشند. مزیت جداسازی بالای رد یاب (MS-detector) در کروماتوگرافی گازی، در مقایسه با کروماتوگرافی مایع، نقش زیادی ندارد. زیرا قدرت انتخابی بالا سبب کمتر شدن دقت کروماتوگرافی می شود. برعکس در کروماتوگرافی مایع، با کاربرد استوانه های کوتاهتر، زمان آنالیز کمتر و حجم انجام کار بیشتر می شود. به همین دلیل یکی دیگر از افزایش تحلیل کروماتوگرافی مایع، فنآوری (UPLC) Ultra Performance Liquid Chromatography می باشد که ناشی از آب است. به نظر نگارنده این فنآوری در مقایسه با کروماتوگرافی مایع، مزیتی ندارد که بتواند

استفاده از (UPLC) را توجیه کند. (فنآوری UPLC با فشاری معادل 1000 بار کاری کند و دارای استوانه های مخصوصی با ذرات ماتریکس به قطر کمتر از 2 μm است).

مزیت اسپکترومتر انبوه سنج در مقایسه با سایر سیستم های ردیاب، امکان کار هم زمان با تعداد زیادی از مواد مورد تجزیه، داشتن حق انتخاب (selectivity) بالا، که با به کار بردن Tandem-MS و استفاده از تجزیه کنندگان با تحلیل بیشتر، به مزیت آن باز هم افزوده می شود.

شکل 2 : رد یاب (MS-detector) پیشرفته مربوط به اسپکترومترانبوه سنج (mass Spectrometry) دربخش بیولوژی مولکولی و تحقیقات قارچ زهر Mycotoxine دانشگاه گوتینگن (عکس از Petr Karlovsky)



ردیاب اسپکترومتر (TOF) که برای اتصال به کرماتوگرافی گازی (GC) یا کرماتوگرافی مایع (HPLC) در بازار به صورت تجاری عرضه می شود، از نظر زمان کار و قیمت با نوع ساده ردیاب های یونی (Ion detector) و یا (Triple-Quadruple) قابل مقایسه می باشند زیرا عبور مایع در آن ها حداقل دوبرابر بهتر شده است. عیبی که دارند برای کارهای زیاد روزانه مناسب نیستند زیرا تنگ ترمی باشند. به تازگی ریزش یا آبشار، یون زیاد با کمک فناوری جدید (High Resolution Isolation Technology از شرکت Thermo Electron) بهتر شده است. این دستگاه برای ایزوله کردن یون های مقدماتی (precursor Ions) مورد استفاده دستگاه Tandem-MS می باشد. دستگاه های جدید تری که باز هم تسهیلاتی در آبشار یون انبوه بوجود می آورد، بزودی وارد بازار خواهند شد.

حساسیت ردیاب اسپکترومترانبوه سنج مایع (HPLC) برخلاف آن چه معروف شده است، بیشتر از حساسیت ردیاب های فتومتری (photometric detector) و یا فلورومتری (fluorometric detector) نیست. البته مشکل است که نسبت به حساسیت ردیاب های مختلف اظهار نظر کرد، زیرا یونیزه شدن مواد با هم متفاوت است، ساختمان این وسایل با هم فرق می کند و از آن ها استفاده های مختلفی به عمل می آید. لذا قضاوت درباره آن ها به فاکتورهای زیادی بستگی دارد. برای تجزیه

بیشتر مواد در یک آزمایشگاه تجزیه معمولی (Triple-Quadruple) با وسایل آبخاریون که قیمت متوسطی داشته باشد، می توان وسایل مورد نیاز را بدین گونه تصور کرد: اسپکترومتر گازی (GC-MS) مجهز به ردیاب الکترونی کلاسیک و یا مجهز به (Thermo Ion mass spectrometry) که دقت آن صد مرتبه پائین تر از ردیاب انبوه سنج است. حساسیت ردیاب با یونیزاسیون شعله ای، تقریباً با ردیاب انبوه سنج، یکسان و قابل مقایسه است. با وصل اسپکترومتر مایع HPLC و ردیاب انبوه سنج با هم، باز هم نمی تواند از نظر حساسیت با ردیاب فلوروسنس رقابت نماید، حتی در مقابل ردیاب های جذب ماوراء بنفش (UV-Absorption detector) هم کم قدرت کمتری دارد، به صورت مثال در پلی آروما ها (poly aroma) که دارای ضریب جذبی (Extinction coefficient) بالایی هستند، مخصوصاً اگر فاقد گروه پولار با قابل پیشرونیز باشند. از این روبه سختی قابل یونیزاسیون می باشند. مشکل حساسیت کمتر بعضی از مواد مورد تجزیه با مزیتی که در بالا برای اسپکترومتر انبوه سنج (MS) ذکر شد، جبران می شود. علاوه بر این به علت تحقیقات مداوم در توسعه اسپکترومتر انبوه سنج (mass Spectrometry)، حساسیت ردیاب های اسپکترومتر انبوه سنج (MS) هم افزایش می یابد. هم زمان با بهتر شدن منبع یونیزاسیون، افزایش شده مقدار زیاد مواد در آنالیزاتور، کیفیت تجزیه نیز بالا می رود، این افزایش راندمان در اثر بزرگ شدن قطر داخلی لوله های باریک (entrance capillare) و ایجاد خلاء زیاد به وسیله پمپ های توربو مولکولی تأمین می شود. مقایسه حساسیت وسایل اسپکترومتر انبوه سنج (MS) با دستگاه های (High-End) در مقایسه نسبی قیمت های آن روشن می شود. البته در مبحث هم، ذکر ارقام مطلق مشکل است. زیرا که دقت آنالیز دستگاه ها، بستگی به تنظیم منبع یونیزاسیون، حساسیت آنالیزاتور یا ردیاب و در نهایت بستگی به مجموع ساختار (Matrix) و نصب این وسایل دارد. افزایش حساسیت را می توان از سری دستگاه های ساخته شده مختلف با دادن یک فاکتور 50 تا 200 مانند (API 2000-API 5000 from Applied Biosystems or Quattro Micro to Quattro Ultima Pt from Waters/Micromass) حدس زد. از امکانات دیگر برای افزایش حساسیت در فناوری یونیزاسیون، یونیزاسیون نوری است که در دست توسعه می باشد. مانند Atmospheric Pressure Photoionization از کارخانه Applied Biosystems. این دستگاه برای کاربرد در مورد تجزیه موادی است که با کاربرد یونیزاسیون پخش الکترونیکی (ESI) Electro spray- Ionisation و یا، با یونیزاسیون شیمیائی تحت فشار اتمسفر (APCI) Atmospheric Press Chemic Ionisation به صورت رضایت بخشی یونیزه نمی شوند.

آینده تجزیه با آزمایشگاه چیب Chip

نوآوری جدید برای تجزیه مواد شیمیایی در تولیدات کشاورزی و مواد غذایی، شاید سیستم های کوچک شده یا مینیاتوری جداسازی و ردیابی است که بسیار ساده شده اند و به نام آزمایشگاه چیب (Laboratory on Chip) نامیده می شوند. جداسازی در یک سکوی (platform) قابل ترمیم (regenerate able) یا غیرقابل ترمیم انجام می شود که اندازه های آن خیلی کوچک تر از وسایل امروزی است. در اثر مینیاتوری کردن وسایل، در زمان و هزینه های آن صرفه جوئی خواهد شد و کاهش حساسیت امروزی به دلیل پهن بودن پیک منحنی در مسیر بلند جداسازی، برطرف خواهد شد. آزمایشی دیگر مورد نظر، یک بار استفاده از مواد جداسازی و همچنین ایجاد امکان تجزیه های موازی و افزایش زمان عبور مواد است امری که تاکنون استاندارد کردن آن میسر نشده است.

در کنار مشکلات ویژه کوچک کردن وسایل مانند مشکلات ساختن آن ها و ایجاد نیروی مکنده (capillarity)، حساسیت ردیاب ها دریافتن مواد (detection) هم مشکلاتی ایجاد می کند. مخصوصا اگر تعداد نمونه های قابل تجزیه زیاد باشند. اگر قطر عبور مواد جداکننده، به صورت هندسی (مجذور) تغییر کند، مقدار مواد قابل تجزیه که به ردیاب ها می رسند به صورت عددی کاهش پیدا می کنند. حساسیت ردیاب ها هنگام کوچک شدن وسایل در رابطه با غلظت، افزایش پیدا می کنند. در این جا باید از توسعه ردیاب هائی هم نام برد که با کاربرد آن ها می توان تجزیه شیمیائی را با مولکول های کمتری انجام داد (ردیاب تک مولکولی **single molecule detection**). در صورتی که واقعا این وسایل به کار افتند، امری که امروزه نمی توان پیش بینی کرد، راه حل دیگری در تجزیه شیمیائی گشوده خواهد شد.

در تحقیقات ژنتیک مولکولی، وسایل مینیاتوری شده به مرحله عملی خود رسیده است. تکنولوژی که به نام DNA-Chip نامیده می شود یا تکنولوژی میکروآرری (**Micro arrays**) در تحقیقات نسخه برداری ها (transcription) به صورت استاندارد به کار برده می شود. اصول این تکنولوژی می تواند برای تجزیه تعداد زیادی از ویروس ها و سایر بیمارگرها به کار برده شود (Lee et al., 2003). حساسیت ردیابی اسید نوکلئیک از طریق هیبریداسیون با فنآوری Micro arrays که مجهز به اولیگونوکلئوتیدها (oligonucleotides) هستند، کمتر از انتظار است و مورد دلخواه تجزیه نمی باشد. نشانه ها (targets) بایستی قبلا با کمک واکنش های زنجیره ای پلی مرز (PCR) تکثیر شوند (amplification). نظربه این که برای تشخیص تولیدات PCR، جایگزین های دیگری با قیمت مناسب تر از فنآوری (DNA-Micro arrays) وجود دارد و حتی با فنآوری دیگری مانند (Real-time PCR)، اندازه گیری کمی در حین کار هم امکان پذیر است، لذا فنآوری (DNA-Micro

arrays) کمتر مورد استفاده تجزیه قرار می گیرد. فقط مواقعی که در نمونه چند عامل بیماری برای تشخیص دادن وجود داشته باشد در آن صورت فنآوری (DNA-Micro arrays) برای هیبریداسیون دی-ان-ای از یک مزیت بیشتری نسبت به پی-سی-آی برخوردار است، زیرا در روی غشاء یا اسلاید آن می توان به به صورت نامحدود از تعداد نمونه های تجزیه شدنی برای هیبریداسیون تارگت ها قرارداد، در صورتی که در Real-time PCR می توان فقط 5 تارگت قرار داد. به علت بهینه سازی و هزینه نشانه گذاری مضاعف سوند ها (Sond) به ندرت بیش از دو نمونه همزمان در Real-time PCR مورد آزمایش قرار می گیرد. لذا در این موارد، اگر چندین تارگت با کمک (-DNA Arrays) بایستی به صورت موازی تکثیر و اثبات شوند، ترکیب PCR با یک هیبرید کننده (-DNA Micro arrays مناسب تر است (Hadidi, Czosnek & Barba, 2004). وسایل آزمایشگاهی بر اساس Micro arrays برای تشخیص و آنالیز در گیاه پزشکی کمتر به وسیله کارخانجات ساخته و عرضه می شوند. شرکت رنلاب دن هان (Relab Den Haan) درواگنیگ هلند، وسیله ای بر پایه (-DNA Arrays) ساخته است که می تواند در حال حاضر 38 عامل بیماری قارچی را تجزیه و اثبات نماید. شرکت (DNA-scan GmbH) در شهر گیلرسهایم، راندمان و طیف تشخیص عامل بیماری های قارچی را با فنآوری خود به 50 نوع قارچ افزایش داده است. اما تولید وسایل این شرکت به علت عدم فروش می بایستی بمدت شش ماه تعطیل می شد.

کاربرد وسایل مدرن تجزیه و تشخیص در تولیدات گیاهی و فرآورده های مواد غذایی

هدف روش های تجزیه و تشخیص در کشاورزی و فرآورده های مواد غذایی تشخیص، شناسایی و تعیین کمیّت ارگانیزم ها در این مواد است. مواد پیچیده مورد تجزیه، از یک ماده شیمی ساده تا مخلوطی از مولکولها با وزن مولکولی کم تا وزن مولکولی زیاد متفاوت است. ارگانیزم های مورد نظر شامل ویروس ها، ویروئید ها، باکتری ها و میکوپلاسم ها و قارچ ها و نظایر آن ها است. پردازش های تجزیه کمیّتی و تشخیص، در زنجیره گیاهان زراعی از کاشت در مزرعه تا کنترل کیفیت در تجارت مواد غذایی را شامل می شود. موادی که باید در تولیدات کشاورزی و فرآورده های مواد غذایی مورد بررسی قرارداد را می توان در سه گروه تقسیم کرد. اول ترکیبات شیمیائی که توسط گیاهان و ارگانیزم ها بوجود می آیند و بایستی در فرآورده های نهائی موجود باشند و برای کیفیت محصول خام و مواد غذایی وجود آن ها مهم می باشد. این مواد تعیین کننده کیفیت در تولیدات کشاورزی و فرآورده های مواد غذایی عبارتند از پروتئین ها، چربی ها، نشاسته ها، قند ها، اسید آمینه های معمولی، چربی های غیر اشباع شده، آنتی اکسیدانت ها، ویتامین ها و مواد معدنی. غیر از زهرابه قارچ ها یا

میکوتوکسین ها که سبب پائین آوردن کیفیت غذائی می شوند، مواد طبیعی که برای سلامتی مضر باشند در تولیدات کشاورزی و مواد غذائی دیده نشده است. با پیشرفت های زیادی که در فنآوری سم شناسی اغلب کشورها انجام گرفته است، مقدار حداکثر زهرابه ها که برای سلامتی خطرناک باشد، تعیین و با تصویب قانون و مقرراتی مراعات می شوند. پیش بینی می شود که کنترل زهرابه ها در سال های آینده در نظارت رسمی کیفیت مواد غذائی قرار گیرند. به فرآورده های ثانوی متعلق به گیاهان در مواد غذائی تاکنون توجهی نشده است و این بی توجهی احتمالاً از این نظر است که گیاهان زراعی کاشته شده در آلمان، کمتر دارای مواد سمی ثانوی هستند. در اصلاح گیاهان جدید هم، مقدار مواد سمی آن ها مورد آزمایش قبلی قرار می گیرد. گیاهان زراعی با سمیت بالای بالقوه مانند سیب زمینی مورد توجه طرح برنامه اصلاح سیب زمینی قرار می گیرد. سموم محتوی گیاهان یا درختان میوه کاشته شده در آلمان به صورت جدی مردم را تهدید نمی کنند، بلکه زهرابه های محتوی چای های علفی و داروهای گیاهی و یا عصاره گیاهان برای لاغری مردم را تهدید می کنند که در سال های اخیر اغلب از بازار جمع آوری شده اند. کاربرد کرماتوگرافی مایع HPLC برای شناسائی منبع ترکیبات سمی در این گونه تولیدات نقش مهمی را بازی می کند.

دومین گروه از مواد که اندازه گیری آن ها از اهمیت خاصی برخوردار است، مواد **صنعتی همراه** یا **جانبی** در فرآورده های غذائی است. این مواد در مراحل مختلف تهیه مواد غذائی به دست انسان وارد فرآورده های غذائی می شود. در تجزیه کرماتوگرافی اصل مواد صنعتی همراه یا انواع تغییر یافته آن ها در فرآورده های نهائی قابل اثبات است. باقیمانده سموم دفع آفات و مواد تثبیت کننده سوسپانسیون آن ها جزء این گونه مواد هستند. حداکثر مقدار مجاز این مواد در کالاهای خام و فرآورده های غذائی طبق مقررات خاصی تعیین می شود. اندازه گیری آن ها در مراحل فرآوری در وسیله خود کارخانه انجام می شود. علاوه بر آن با اجرای پروژه های آمار برداری، به صورت رسمی طبق یک نمونه برداری تصادفی از بازار، تجزیه و مقدار آن ها تعیین می شود.

با وجود این که از نظر سم شناسی، شباهت زیادی بین زهرابه ها و سموم مواد طبیعی و باقیمانده سموم دفع آفات وجود دارد، اما سموم دفع آفات، باقیمانده سموم در چای و باقیمانده سموم در سایر مواد غذائی بیشتر در مرکز توجه قانون گذاری، مصرف کنندگان و رسانه های همگانی قرار دارد. دلیل این امر نگرانی عمیق از تولیدات صنعتی است که در زنجیره محیط زیست برای مواد غذائی خطرانی را در پی دارد. بر طبق این اصل با وجود سخت گیری های زیاد در صدور مجوز برای سموم و آزمایش های قبلی برای کنترل زهرابه ها، هنوز نتوانسته اند از نگرانی مردم بکاهند. مواد جانبی در مقابل مواد طبیعی که اغلب بی خطر قلمداد می شوند با وجود این که در میان آن ها تعداد زیادی سمی و حتی

سرطان را هستند، در لیست کنترل های صدور مجوز قرار ندارند (Gold, Ames, & Slone, 2002). غیر از مواد صنعتی نامطلوب، مواد دیگری مانند ویتامین ها، مواد طعم دهنده، مواد معطر و آنتی اکسیدان ها هم به فرآورده های غذایی وارد می شوند تا کیفیت آن را افزایش دهند. مقدار و نوع این مواد هم در کنترل اندازه گیری کیفیت قرار دارد.

کنترل مقدار مواد صنعتی نامطلوب که به عنوان مواد مخلوط یا آلوده قلمداد می شوند، در ارزشیابی تولیدات کشاورزی بسیار مهم تر از پروتئین ها و سایر مواد غذایی است. در آلمان، در اثر تهیه مواد مصرفی بسیار خوب و با کیفیت بالا و قیمت مناسب، تعادل کیفیت با مواد غذایی مردم تأمین است و تقریباً مواد غذایی با کیفیت بد وجود ندارد، مگر مواد غذایی خود مردم، شخصاً نسبت به تدارک و تهیه آن اقدام کنند. تولید بیش از حد مواد خام غذایی در آلمان سبب شده است که فرآورده های جدیدی با این که کیفیت بهتری از نظر علمی ندارند، با مشخصاتی دیگر تولید شوند. این تولیدات در سوپر مارکت ها با عنوان های بسیار مثبت کیفیت عرضه می شوند که این عنوان ها از لغات بیو (Bio)، اکو (Eco) و طبیعی (Nature) مشتق می شوند. تجزیه شیمیائی این مواد خام بسیار مهم است، زیرا زیرا موادی که تحت عنوان تولیدات بیو عرضه می شوند بایستی عاری از استعمال سموم دفع آفات باشند. در اکثر موارد مخصوصاً از نظر تجزیه شیمیائی، مشخصات متفاوتی در آن ها دیده می شود. کارخانجات، فرآورده های مواد خام خود را، شخصاً بررسی می کنند یا این که این وظیفه را به شرکت های دیگری واگذار می کنند. در واقع تولیدات اکو دارای مقدار کمتری از باقیمانده سموم دفع آفات هستند تا تولیدات غذایی دیگر و با این که این اختلاف از نظر سم شناسی کاملاً بی ربط است به مصرف کننده اطلاع داده نمی شود. در قطع نامه گروه کاری سنا، « کیفیت و ارزشیابی مواد غذایی جایگزین سنتی » انستیتوهای فدرال برای تحقیقات (BMVEL) آمده است (Tauscher et al., 2003): « تا امروز هیچ گونه دلیل علمی وجود ندارد کلاً یا در بیشتر موارد مصرف مواد غذایی اکولوژیکی، مستقماً سبب بهبود سلامتی انسان می شود ».

در فرآیند فرآوری غیر از مواد همراه طبیعی، مواد همراه صنعتی و یا فرآورده آن ها، گروه سوم نیز در تجزیه شیمیائی مواد غذایی یافت می شود. این مواد را که آلوده گی به مواد بیگانه می نامند یا به صورت رسمی اضافه شده اند یا واکنش شیمیائی نامطلوبی هستند که ضمن فرآیند فرآوری وارد زنجیره مواد غذایی شده اند. عناصر فلزات سنگین و سموم دفع آفات غیر مجاز، شامل این گروه می شوند که گاهگاهی در سبزیجات و میوه ها وجود دارند. یافته های این گروه سوم کم و به تعداد آن ها هم اضافه نشده است، اما در صورت یافتن آن ها سبب بی قراری مردم می شود. زیرا خطرات زیادی برای سلامتی مردم دارند و ممکن است سرطان را هم باشند. نمونه برجسته این گروه موضوع آلودگی شراب در سال های اخیر است. برای بهتر کردن مزه شراب به آن پلی اتیلن گلیکول (polyethylene)

glycol) اضافه شده بود تا عطرکهنه گی چوب را داشته باشد یا اضافه کردن آکریلامید (Acryl amid) درپخت نان و درفرایند فرآوری سیب زمینی، ماده ممنوعه آنتی بیوتیک درگوشت و ماده نیتروفوران (Nitro furan) درگوشت پرندگان.

تشخیص بیماری های گیاهی ازراه تجزیه محصولات کشاورزی، دردرجه اول برای کمک به عملیات دفع آفات می باشد (McCartney et al., 2003). این تجزیه درمورد بعضی اززراعت ها که دارای ارزش والائی دارند، قابل توجیه است، زیرا هزینه اقدامات تجزیه به قیمت تمام شده آن بیش ازحد اضافه نمی کند. غیرازآن تجزیه از نظرگیاه پزشکی برای تولید بذر و گیاه مادری نقش مهمی دارد. اگر بیماری نهفته ای در بذرها ی مادری باشد، از ارزش بذرها کاسته و ادعای جبران خسارت را درنزد بیمه گر توجیه می کند. از اهمیت دیگر تجزیه، تشخیص بیماری های قرنطیه ای در بذرها ی مادری است زیرا علاوه بر نابود کردن کلیه سطح زیرکشت، بایستی مزرعه برای مدت زمانی که از طرف قانون تعیین شده است به صورت آیش و یا بازباقی بماند. بررسی بذرها ی مادری سیب زمینی از نظر بیماری های قرنطینه جزء وظایف مهم ادارات حفظ نباتات است.

PCR یا ELISA : مقایسه این دو روش در تعیین زهرا به قارچ ها (mycotoxin)

زهرا به قارچ ها در تولیدات کشاورزی و تهیه خوراک دامی، به علت تغییر فناوری کشت در سال های اخیر، اهمیت بیشتری پیدا کرده است. پیشرفت های تحقیقات سم شناسی، زهرا به و فراورده های ثانویه قارچ ها را که برای سلامتی خطرناک هستند مرتبا پیدا می کنند. وسایل اندازه گیری زهرا به ها هم در تمام رشته های تولیدی در حال رشد و توسعه است. مقدار زهرا به در محصولات غذایی و خوراک دام طبق قانون در تمام اروپا یکسان است. حداکثر مقدار زهرا به بایستی به صورت رسمی مورد نظارت قرار می گیرد. تاکنون مقدار حداکثر سه زهرا به ی زهرا به آلفاتوکسین (Aflatoxine)، دزاکسی نیوالنول (Deoxynivalenol) و زارآلنول (Zearalenol) در اروپا به صورت رسمی تعیین شده است. مقدار حداکثر برای دو زهرا به آخر از اول جولای 2006 تعیین شده است. منظور از این کنترل پیش گیری از تشکیل زهرا به است. شرط اساسی برای شناسائی فوری زهرا به ها و تعیین ریسک آن ها، وجود وسایل حساس با سیستم تجزیه قابل اطمینان قارچ های تولید کننده میکوتوکسین است.

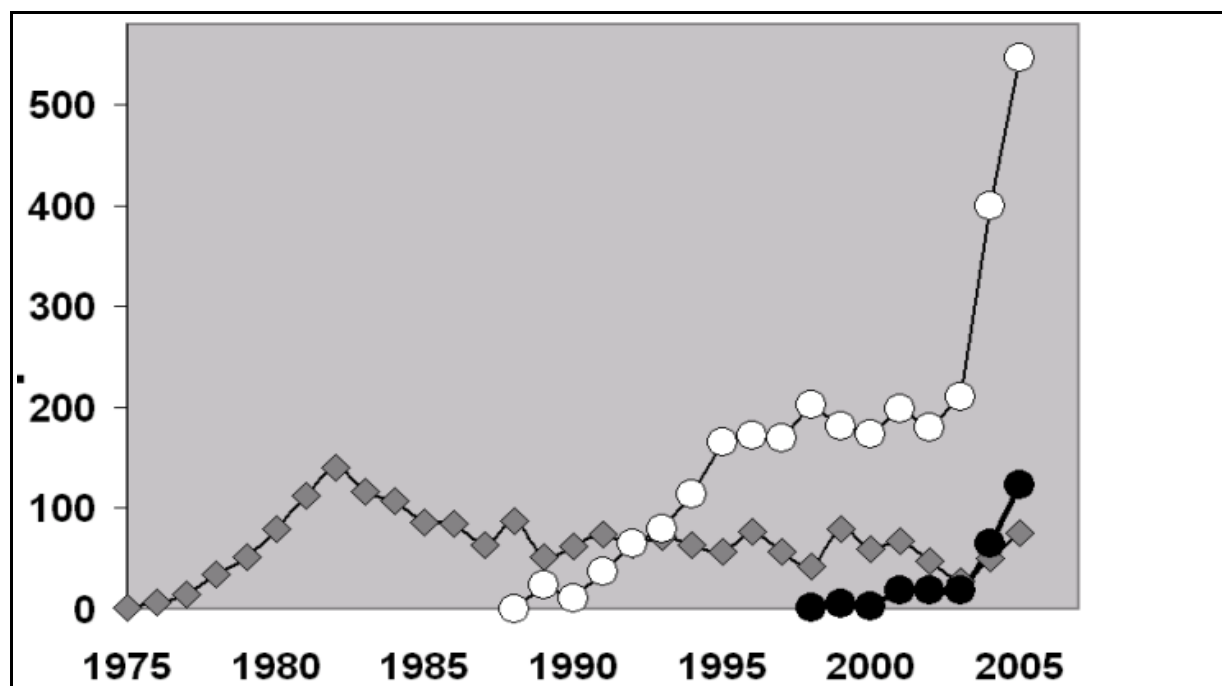
الایزا Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) توسعه الایزا در اواسط دهه هفتاد میلادی به وقوع پیوست و به سرعت به صورت یک روش استاندارد برای تشخیص در گیاه پزشکی درآمد و ارزش اقتصادی تشخیص سرم شناسی آن مورد قبول واقع شد. یک مقاله در این مورد در سال

1984 در بیزنیس ویک (Business Week) تحت عنوان تشخیص گیاهان : بذرجدید صنعت (Anon., 1984) منتشر شد. جالب این که در آن موقع در مقاله منتشر شده، استفاده از بیوتکنولوژی برای تشخیص علائم بیماری های گیاهی به کار رفته بود (Companies are beginning to use biotechnology to identify symptoms of disease in plants). محتوی مقاله البته صحت نداشت زیرا مزیت پردازش های مولکولی و بیوتکنولوژی و توانایی کاربرد آن ها در این است که عامل بیماری ها را قبل از نفوذ به درون گیاه و ایجاد علائم، شناسائی کند. امروز آنتی سرم چند همسانه سازیه سازیه ای (polyclonal antibody) و آنتی سرم تک همسانه سازیه ای (monoclonal antibody) و بسته های کامل الیزا برای مهم ترین بیماری های قارچی، به صورت تجارتي در دسترس می باشد و فتومتری الیزا یک وسیله معمولی در تشخیص، در اغلب آزمایشگاه ها شده است.

حساسیت الیزا به بررسی های پزشکی اغلب کافی و مقرون بصره است. محدودیت الیزا در ویژگی آن است. به عنوان مثال تعیین گونه های فوزاریوم تولید کننده زهرابه در غلات، خطرات این زهرابه نامیده می شود. با الیزا نمی توان فوزاریوم های خویشاوند را از هم تشخیص داد. طبق این اصل در کاربرد الیزا، خوشه غلات آلوده به فوزاریوم هائی که زهرابه درست نمی کنند، نتیجه و اطلاعات غلط به دست می آید. ویژگی آزمایش الیزا با یک قارچ را می توان تا حدودی با انتخاب یک آنتی ژن یا اشباع کردن آنتی ژن با آنتی سرم غلط بهتر کرد. تفاوت قابل اطمینان بین قارچ های هم تبار وجود ندارد. بعد از آنکه مقدار دوکسی نیوالنول (Deoxynivalenol) به حد قابل اندازه گیری رسید، به جای قارچ تولید کننده این زهرابه، خود زهرابه را می توان اندازه گیری کرد. بسته آماده الیزا برای دوکسی نیوالنول (Deoxynivalenol) به صورت تجارتي توسط شرکت های زیادی عرضه می شود. معمولاً برای تصمیم گیری و اطمینان این که در یک نمونه غلات، زهرابه محتوی آن به حداکثر قانونی رسیده است، دقت سنجش الیزا برای این کار کافی می باشد. در سنجش الیزا برای مقدار دوکسی نیوالنول (Deoxynivalenol) کمی زیاده روی می شود، شاید به خاطر این است که آنتی سرم مخصوص دوکسی نیوالنول سایر مشتقات تریکوتس ها (trichotheces) را هم به خود جذب می کند.

فناوری Polymerase Chain Reaction (PCR) از اوایل 1990 میلادی برای تشخیص بیماری های گیاهی مورد استفاده قرار گرفت. ویژگی آزمایش بر اساس پی-سی-آر را می توان با انتخاب آغازگر (primer) دقیقاً با هدف مورد دل خواه تنظیم کرد.

شکل 3 : تعداد مقالات در به آنک مقالات آگریکولا (AGRICOLA)، مربع خاکستری تعداد مقالات در مورد الایزا (ELISA)، دایره های سفید تعداد مقاله های (PCR) و دایره های سیاه تعداد مقاله های منتشر شده درباره (Real-time PCR) را نشان می دهند .



اینک برای زهرابه فوزاریوم های مهم گیاهی، آغازگرویده وجود دارد. ویژگی تجزیه پی - سی - آر می تواند هم از قسمت های توالی (sequence region) وهم از محل اتصال آغازگر، افزایش دهد، نه تنها طبقه بندی و تاکسونومی ارقام از هم قابل تشخیص می شوند (*formae speciales*)، بلکه جمعیت و ژنوم آن ها هم می توانند از هم متمایز شوند. از طرف دیگر، تست هائی را می توان برای گیاه پزشکی توسعه داد که چند نوع از قارچ ها را که دارای زهرابه مشترک هستند یا باهم خویشاوندی دارند، باهم تشخیص داده شوند. به عنوان مثال برای قارچ های فوزاریوم که زهرابه تریکوتس تولید می کنند، یک نوع (PCR) تهیه شده است که در آن قسمتی از تجزیه ژن تریکوتس (Tri5, Trichodiensynthase) را افزایش (amplified) می دهند. این آزمایش می تواند برای تعیین قارچ های تولید کننده دوکسی نیوالنول (Deoxynivalenol) نیز به کار برده شود. در ترکیبی از (PCR) و ترانسکریپتاز معکوس (reverse transcription) یا RT-PCR می توان فعالیت بخشی از ژن

تری کوتیس را مستقیماً در بافت های عفونی مطالعه کرد و بدین طریق اثر قارچ کش ها را در کاهش و تولید دوکسی نیوالنول بررسی نمود که در سال های اخیر موضوع مورد بحث مهم حفظ نباتات می باشد.

PCR در مقایسه با ELISA دارای حساسیت بیشتر و دارای ویژگی های قابل هدایت است. از عیوب آن، غیرازگرانی و کار زیاد جستجوی مشخصات، چگونگی یافته های آن است، زیرا در نهایت فقط کیفیت یافته ها را عرضه می کند. بدلیل خواص اشباع کنندگی واکنش ها، شدت یافتن مزاحمت ها به صورت هندسی (exponential amplification) و تغییرات آماری، یک رابطه مطمئن بین اندازه گیری مقدار (template quantities) و تولید (product) ممکن نیست.

در فناوری PCR از نوع (Real-time PCR) یافته ها در ضمن جریان آزمایش به صورت مداوم، نشان داده می شوند. این فناوری سبب برطرف شدن عیوب PCR ساده شده است و از آن به صورت یک روال آزمایشی، در آزمایشگاه استفاده می شود. یافته ها (Detection) در هر سیکل PCR با فلورسنس (fluorescence) اندازه گیری می شود. برای این اندازه گیری فلورسنس، یا از یک رنگ آمیز (DNA) مانند (SYBR Green) استفاده می شود که یافته های فلورسنسی در اثر جذب به DNA افزایش می یابد، یا این که سوند های هیبریداسیون مخصوص (hybridization)، اتصال تولیدات (Real-time PCR) را برای تغییر فاصله بین فلوروفور (Fluorophor) و مواد رنگی هدایت می کند که می توان آن را با انرژی فلوروفور تعویض کرد. تغییر فاصله سبب تغییر شدت علائم فلورسنس می شود. هر سیکل (Real-time PCR) که در آن اندازه فلورسنس بیش از حد افزایش یابد، به عنوان آستانه مرزی (Threshold Cycle (Ct) نامیده می شود. مقدار این آستانه مرزی بستگی به مقدار یافته ها (template quantities) دارد. پیش از آمار برداری از نتیجه کمی یافته های (Real-time PCR)، یک منحنی مقایسه ای (calibration) از مقدار آستانه مرزی (Threshold Cycle) و اندازه یافته ها (template quantities) را ترسیم و به دست می آورند. غیر از خواص کمی، یافته های (Real-time PCR) این مزیت را دارد که با فرستادن هر نمونه و پایان تجزیه آن، عملکرد و کارروی نمونه های بعدی (Real-time PCR) ضروری ندارد. یعنی یک آنالیز اتوماتیک از واکنش نمونه ها با کمک پی پت های نوع روبات (Roboter) تا به دست آمدن نتیجه نهایی همه نمونه ها، امکان پذیر است. به دلیل عدم نیازه به باز کردن ظرف های Real-time PCR بعد از انجام واکنش ها، و به علت حساس بودن این فناوری به طول عمر استفاده از آن ها افزوده می شود. وسایل مورد استفاده (Real-time PCR) در پزشکی، پس از گذشت یک مدت معین برای تجزیه های کمی در گیاه پزشکی به کار برده شده است (Schema, Nigro, Ippolito & Gallitelli, 2004). ایجاد تشکیلات و سرمایه گذاری به علت بالا رفتن هزینه های عصاره گیری DNA و هزینه های تجزیه DNA در حال حاضر هزینه های تجزیه بیماری های گیاهی در حفظ نباتات و در سایر مراکز تحقیقاتی را افزایش داده

است. با کوچک کردن یا منیاتوری کردن این وسایل می توان در هزینه ها صرفه جوئی کرد. در صورتی که منیاتوری کردن وسایل PCR عملی شود، این فناوری پیشرفته می تواند در تجزیه و تشخیص روزانه گیاه پزشکی با سنجش سرولوژیکی ELISA رقابت نماید.

وسایل (Real-time PCR) حداقل از طرف 8 شرکت سازنده عرضه می شود. قیمت یک سیستم کامل از 25000 یورو تا 120000 یورو در نوسان است. در بازار، مدل های این وسیله با دوطرح مختلف عرضه می شود.

مدل اول ظرف های (Real-time PCR) در یک گرداننده قرار دارد و به صورت ممتد یا متناوب در امتداد یک واحد ردیاب در حال چرخش است و گرم کردن واکنش های ایجاد شده از طریق هوا انجام می شود. از این مدل ها، LightCycler از شرکت Roche؛ و RotorGene از شرکت Corbett Research را می توان نام برد. این مدل ها را می توان به سرعت گرم و یا سرد کرد. این مدل ها، حرارت ثابت و مشابه را برای نمونه ها تضمین می کنند.

مدل دوم (Real-time PCR) دارای سیکل حرارتی (Thermo cycle) و صفحاتی با چاهک های کوچک (Micro titer plate) است. و از گرداننده فلزی معمولی، حرارت برای تنظیم گرما می گیرد. از این مدل ها MX4000 از شرکت Stratagene؛ نوع iCycler از شرکت BioRad؛ نوع ABI PRISM 7700 از شرکت Applied Biosystems را می توان نام برد. به نظر این قلم، انواع با ترموبلوک در صفحاتی که دارای فرم های میکروتیتیدارند برای آزمایش روزانه مناسب تر است. زیرا اتوماتیک کردن مراحل پی پت و پرکردن دستگاه را آسان ترمی سازد (صفحات با چاهک های میکروتیتیر، از وسایل معمولی یک آزمایشگاه بیوآنالیز است) و مواد مصرفی هزینه کمتری دارد. مصرف کننده می تواند با سفارش مخصوص، نوعی از وسایل LightCycler از شرکت Roche دریافت کند که مزیتی خاص دارد. یعنی مدت تجزیه کمتر از 30 دقیقه را امکان پذیر می سازد. وسایل با زمان کمتر هم در آمریکا برای مبارزه با تروریسم تهیه شده است. این وسایل برای کارکردن در صحرا ساخته شده و با باتری کار می کند (SmartCycler ساخت شرکت Cepheid). این وسیله برای کاردائی روزانه در آزمایشگاه مناسب نیست. در انتخاب یک بلوک حرارتی با دید توجه داشت که دارای طول موج و یا امکان توسعه آن وجود داشته باشد که بتوان یافته ها و یا آلاینده ها (emmission) را تشدید کرد (امکان طول موج در آینده در Fluorophore و Multiplex وجود خواهد داشت)، گرم کردن در بلوک حرارتی باید یکنواخت (مخصوصا در اطراف خارجی بلوک) باشد، امکان استفاده از درجات حرارت مختلف وجود داشته باشد. بهینه سازی نرم افزارها، طرز کار ساده تر پی-سی-آر، فرستادن نتایج یافته ها برای تهیه گزارش و سایر امکاناتی رایانه ای، در دست توسعه بیشتر است.

به علت داشتن فنآوری بهتر، می توان پی-سی-آر را جایگزین الایزا برای تشخیص در گیاه پزشکی کرد. فاکتور محدود کننده در این جایگزینی، هزینه زیاد پی - سی - آر است. تهیه نمونه ها برای پی-سی-آر (عصاره گیری از دی-ان-ای) و تجزیه آن ها، در مقایسه با فرایند طولانی مدت الایزا گران تر است. هزینه عصاره گیری از دی-ان-ای را می توان با خرید بسته های تجاری برای این منظور کاهش داد اما اگر مقدار نمونه های مورد بررسی زیاد باشد، بسته های آماده تجاری مناسب نیست. هزینه DNA-Sensor فقط از طریق کاهش هزینه نشان گذاری فلورسنس اولیگونوکلیئید ها امکان پذیر است که در حال حاضر بعید بنظر می رسد. به این ترتیب کاربرد الایزا که حساسیت و ویژگی آن برای تشخیص بیماری های گیاهی کافی می باشد، همچنان باقی می ماند.

استفاده از فنآوری گران تر Real-time PCR در محلی که امکان کاهش هزینه موجود باشد و کنترل محصولات مهم تری نظیر بررسی کشت مریستم، کنترل بیماری های قرنطینه ای و تکثیر گیاهان زینتی گران قیمت در برنامه کار باشد از نظر اقتصادی به صرفه است. گرایش روش های تشخیص در کشاورزی را می توان از تعداد مقالات منتشر شده در به آنک اطلاعات علمی آگریکو AGRICO (شکل شماره 3) ارزشیابی کرد. الایزا در سال 1982 بیشترین کاربرد خود را با 140 مقاله به دست آورد و اکنون به یک سطح ثابت و پایدار، بین 40 تا 70 مقاله در سال رسیده است. کاربرد پی - سی - آر در سال 1995 به سطح 170 تا 200 مقاله در سال رسید و در سال 2003 به سرعت افزایش یافت. پی-سی-آر با کارمدام Real-time PCR در سال 1998 برای اولین بار وارد انتشارات شد. ابتدا، در علوم کشاورزی و فنآوری های مربوطه، مقالاتی در مورد استفاده از این فنآوری به ندرت دیده می شد، بعد از آن، تعداد مقالات پی-سی-آر با کارمدام Real-time PCR در بخش کشاورزی در موازات PCR ساده افزایش یافت. در انتشارات گیاه پزشکی این روش بیشتر در مواردی به کار برده می شود که الایزا حساسیت کافی نسبت به نمونه مورد بررسی نداشته باشد یا در بازار بسته های آماده آنتی سرم برای الایزا در دسترس نباشد. در موارد خیلی کم، تست های الایزا، جای PCR را گرفته است. PCR بیشتر در کشاورزی برای بررسی گیاهان تراریخته داده مانند بررسی انبوه بذر مادری، تولیدات کشاورزی و فرآورده های غذایی منشعب از آن ها، به کار برده می شود. انتظار می رود در سال های آینده، با افزایش فرآورده های گیاهان تراریخته و تجارت آن ها پی-سی-آر با کارمدام Real-time PCR نیز کاربرد بیشتری در گیاه پزشکی و کشاورزی داشته باشد. شرکت های تولید فرآورده های غذایی، واحد های کوچک و متوسط تجاری کشاورزی، گروه های کاری و آزمایشگاهی در سازمان های دولتی و دانشگاه ها در حال مجهز شدن به روش های مدرن تجزیه و آنالیز هستند. اتحادیه های مانند پروژه اروپائی EU-Projects، گروه کاری تجزیه با PCR در VDLUFA هم در حال تجهیز و توسعه این فنآوری هستند. در اروپا هم، روش های PCR بسیار متفاوت و متغییر از هم برای

مطالعه گیاهان تغییرژن داده به کارمی رود . کاشت گیاهان تغییرژن در سطح وسیعی، در نظر است در اروپا هم اجرا شود . در آن صورت نیازه کاربرد عملی تجزیه و آنالیز این گیاهان هم بیشتر و تقاضا را بسیار افزایش خواهد داد، مخصوصا در بسیاری از کشورها که تغییرات در ژنوم را در گیاهان زراعی خود شروع کرده اند و سال ها است که این روش به کارمی رود.

Literature:

- Anon., 1984: Plant diagnostics: Seeds of a new industry. Business Week, September 17, McGraw-Hill.
- Careri, M., Mangia, A. and Musci, M., 1996: Applications of liquid chromatography-mass spectrometry interfacing systems in food analysis: pesticide, drug and toxic substance residues. *Journal of Chromatography A* 727, 153 - 184.
- Gold, L.S., Ames, B.N. and Slone, T.H., 2002: Misconceptions About the Causes of Cancer. In: *Human and Environmental Risk Assessment: Theory and Practice* (D. Paustenbach, ed.) New York: John Wiley & Sons, pp. 1415-1460.
- Hadidi, A., Czosnek, H. and Barba, M., 2004: DNA microarrays and their potential applications for the detection of plant viruses, viroids, and phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* 86, 97-104.
- Hensley, P. und Myszka, D.G., 2000: Analytical biotechnology: sorting needles and haystacks. *Current Opinions in Biotechnology* 11, 9 - 12.
- Lee, G.P.M.B.ESCHERICHIA, Kim, C.S., Choi, S.H., Rarn, C.H., Kim, S.U. and Ryu, K.H., 2003: Plant virus cDNA chip hybridization for detection and differentiation of four cucurbit-infecting Tobamoviruses. *J Virol Methods* 110, 19-24.
- McCartney, H.A., Foster, S.J., Fraaije, B.A. and Ward, ESCHERICHIA, 2003: Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science* 59, 129 - 142.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A. and Gallitelli, D., 2004: Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 110, 893-908.
- Tauscher, B., Brack, G., Flachowsky, G., Henning, M., Köpke, U., Meier-Ploeger, A., Münzing, K., Niggli, Z., Pabst, K., Rahmann, G., Willhöft, C. und Mayer-Miebach, ESCHERICHIA, 2003: Bewertung von Lebensmitteln verschiedener Produktionsverfahren. Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft.
- Vestal, M.L., 1984: High-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Science* 226, 275 - 281.

نیازهای نوآوری در حفظ نباتات : جلب توجه دانشمندان

یورگن ریمپاؤ

Jürgen Rimpau

Domplatz 48, 38820 Halberstadt (Juergen.rimpau@t-online)

پیشگفتار

فناوری که امروز در حفظ نباتات به کار برده می شود خیلی دیر شروع شده است و اثر خیلی کم در دفع آفات و بیماری ها دارد. راهبرد های امروزی سطح مبارزه را به حد رضایت بخش نمی پوشاند. در صورت وجود باد مقدار زیادی از سموم دفع آفات از دست می رود. در هوای گرم مقدار تبخیر زیاد و راندمان مبارزه آن کم، و مصرف آب برای سم پاشی زیاد است. برای حمل سم و سم پاشی در مزرعه راه زیادی طی می شود و با طولانی شدن ترابری فشار زیاد به سطح مزرعه وارد می شود و در نهایت محیط زیست بی جهت آلوده می شود. با توجه بمراتب بالا، فناوری حفظ نباتات نیاز به روز شدن، تحول در تشکیلات کشاورزی و احتیاج به تغییرات زیاد قابل لمس دارد.

فناوری

وسایل مدرن دفع آفات در آینده باید اتومایک و خودکار باشد و خدمات خود را بطور مرکزی به تمام واحد های کشاورزی ارائه دهد. ماشین آلات باید طوری طرح ریزی شوند که قادر باشند در سطح مزرعه برای عملیات دفع آفات با سرعت 20 کیلومتر در ساعت اقدام کنند (در نمایشگاه آگری تکنیکا Agritechnica سال 2005 چنین ماشین آلاتی به معرض نمایش گذاشته شد). ارتفاع بلند ماشین آلات جدید، کار کردن در مزرعه منداب را که در حال گل است بدون وارد کردن صدمه، ممکن خواهد ساخت. باید با ساختن بازوهای بلند و محکم سم پاش، ردیف های کاری به عرض 36 تا 48 متر برای محلول

پاشی استاندارد شود تا در کاربرد های افقی یا عمودی این بازوها آرام تر شود. فنآوری جدید از ساختمان بازوهای سم پاش شروع نمی شود بلکه از ماشین های حمل کننده آن (درنمایشگاه آگری تکنیکا Agritechnica سال 2005، مدل های آن به نمایش گذاشته شد) آغاز می شود.

با افزایش قدرت اجرائی (حداقل 50 هکتار در ساعت یا 500 هکتار در روز)، آب مورد مصرف نباید از 50 لیتر در هکتار، یا حداکثر 100 لیتر در هکتار تجاوز کند. برای اجرای این راندمان باید در تهیه و فرمولاسیون سموم دفع آفات تجدید نظر کرد و فنآوری دهانک محلول پاش ها (spray valve) تغییر کند. پاشیدن مقدار آب کمتر در هکتار، مستلزم عوض کردن فشار در دهانک سم پاش به علت حرکت سریع تر ماشین آلات است. گرفتگی دهانک سم پاش بگذشته تعلق خواهد داشت. طبیعی است که در صورت سم پاشی در شب، برسیستم فنآوری دهانک سم پاش باید نظارت شود. برای کاستن فشار از سطح مزرعه، باید ظرفیت سم پاش 2000 لیتر یا حد اکثر 3000 لیتر و همزمان قدرت محلول پاشی حفظ شود (هرتانک پر شده برای مصرف 40 تا 60 هکتار به میزان 50 لیتر در هکتار). قدرت محلول پاشی، با پر شدن مستقیم نیز افزایش پیدا می کند، برای حذف مخلوط کردن باید ظروف سموم بازسازی شود و فقط آب به تانک اضافه گردد.

در ماشین های ترابری آینده، پهنای لاستیک ها و فشار هوای داخل آن ها بهینه سازی خواهد شد. برای کاهش مصرف آب و افزایش قدرت محلول پاشی، بایستی سم پاشی در شب انجام شود. زمان سم پاشی در شب بستگی به وزش کم باد و تبخیر سموم دارد. دستمزد به هدر رفته، در مقایسه با هدفی که به آن می رسیم کمتر و قدرت محلول پاشی خیلی بیشتر است. در صورت رسیدن به هدف، مصرف سم هم کاهش پیدا می کند.

عملکرد سم پاشی قسمت هائی از مزرعه (مثلا کرت ها یا ردیف ها) به صورت انتخابی با پر شدن اتوماتیک مخزن برای علف کش ها و مواد کوتاه نگاه دارنده ساقه (stem shorter) استاندارد می شود. روش سم پاشی قسمت هائی از مزرعه (مثلا کرت ها یا ردیف ها به صورت انتخابی) را می شود برای عملیات قارچ کشی هم اجرا کرد، اگر احتمال بروز بیماری به تراکم بوته های کاشته شده بستگی داشته باشد یا این که انتقال بیماری به وسیله قارچ های خاکزاد صورت می گیرد، سم پاشی بخش های انتخابی مزرعه مناسب تر است. امروزه، آمار برداری از تراکم بوته با فرستنده های حسی (N-Sensors) و با انترنت هم امکان پذیر است. به علت تراکم متفاوت پوشش مزرعه با علف های هرز و توزیع نامنظم آن ها در نقاط مختلف، با دوربین های مخصوص شناسائی (Online-recognition) حتی در شب هم ضروری و امکان پذیر است. شناسائی گیاهان کوتاه نگاهداری شده با مواد کوتاه نگاهدارنده ساقه ضروری است. زیرا پس از گسترش در قسمت های ویژه مزرعه ممکن است سبب کاهش بیش از حد محصول شوند (آزمایش های شخصی و گزارش NU-Agrar,

Böhnshause از 2004 تا 2006). برطبق این اصل پرکردن مستقیم مخزن ضروری است، زیرا درآینده ترکیب سموم (برای قسمت های ویژه جهت کوتاه نگاه داشتن) از کوتاه کننده ها و قارچ کش ها (برای تمام سطح مزرعه) باید به صورت مجزا استفاده شود. آینده این وسایل در دست تحقیق است و فقط تحقیقات در رشته های مختلف می تواند ما را به هدف برساند. نتیجه تحقیقات هم باید، درزمینه های فنآوری وسایل حمل و نقل، فنآوری دهانک سم پاش، فنآوری پرشدن اتوماتیک ظرف سم، نرم افزار برای شناسائی تغییرظاهری گیاه درروز و درشب، ریزش محلول به صورت مستقیم، فرمولاسیون اتوماتیک و مخلوط کردن پشت سرهم سازگارباشند. ریزش مستقیم محلول، منجر به تغییر فرمول شیمیائی و مصرف کم آب می شود. درکنار تحقیقات، مسئولین صدورمجوزسموم دفع آفات هم بایستی خود را با جریان تهیه و آماده کردن سم تا امکان مصرف مقدار کم آب و فنآوری پاشیدن با سیستم جدید هماهنگ کنند. دریک سیستم تخصصی خوب نباید محلول پاشی درمقدار مصرف امروزی آن یعنی 200 لیتر در هکتار باقی بماند.

اگر فرض شود که صنعت سم سازی موافق چنین سیستمی نباشد دلیل آن پائین آمدن مصرف سموم دفع آفات و کاهش درآمد آن ها است و آن ها می توانند هزینه تهیه سموم جدید را به تولیدات خود افزایش دهند به شرط آن که سموم کم خطر برای سم پاشی با فرمول های جدید توسعه یابد.

سیستم تشکیلاتی

استفاده از این وسایل درآینده باید به صورت مرکزی برای تمام واحد های کشاورزی آماده باشد و به وسیله شرکت های کاملاً تخصصی دفع آفات اجرا شود. نمونه آن امروزه در برداشت چغندر قند به مرحله عمل درآمده است. هیچ کدام از واحد های کوچک چغندرکاری در کار برداشت چغندر راساً دخالتی ندارند. این عملیات براساس اقتصاد سود بری پایه ریزی شده است. اقدامات محلی و مدارک آن براساس سیستم ماهواره ای GIS و نرم افزار های مدرن انجام می شود. این برنامه با پشتیبانی ماهواره ها به صورت زنده (درآینده در اروپا از سیستم ماهواره گالیئو اروپا European Galileo-System استفاده خواهد شد) عمل می کند. با توجه به پیش گوئی های هواشناسی مدرن و دقیق برای سه روز آینده و با اطمینان از پیشگویی برای 5 روز بعد، اپیدمی بیماری ها را می شود پیشگویی کرد که در این زمان باید اقدامات و قدرت سیستم متوقف شود.

ترابری سموم کشاورزی باید به صورت مرکزی عمل کند. سموم در ظرف های تحت فشار حمل شده و سموم یا سوسپانسیون آن ها، قبل از کاربرد در عملیات سم پاشی به صورت اتوماتیک یکنواخت می شوند.

پرسش های تحقیقاتی مانند شناسائی اپیدمی بیماری ها، تعیین و توسعه راه کارها در مزرعه از طریق سامانه موقعیت یاب از فضا، اقدامات پیش گوئی کوچک از تمام بیماری های مهم در مزرعه، تعیین و محاسبه خسارت به صورت اتوماتیک، وارد کردن این محاسبات در سیستم لجستیک دستمزد واحد های کشاورزی و توسعه نرم افزار برای گشت و اداره تشکیلات، می تواند انگیزه های تحقیقاتی باشد. این سیستم سبب ارزانی و ایمنی برداشت به علت ایمنی عملیات سم پاشی می شود مورد قبول مردم نیز قرار می گیرد، زیرا مواد سمی کمتری در طبیعت رها می شود و محیط زیست در اثر استفاده از وسایل مدرن با مدیریت حرفه ای کمتر آلوده می شود. مخصوصاً نگرانی از ترابری ظرف های سموم، کاملاً بر طرف می شود. این سیستم مناسب پی گیری برگشتی در زنجیره مالی هم است. راه کارهای دیگر فناوری سم پاشی نظیر بارگیری به صورت الکتریکی، گردگیری داخل ماشین، جلوگیری از صدمات ناشی از باد یا جایگزینی ترابری آب با یک وسیله حمل و نقل بهتر را نیز باید توسعه داد.

اصلاح نباتات

خواسته کشاورزان از اصلاح نباتات کاملاً روشن و بارها نیز مطرح شده است. موقعی اصلاح نباتات مورد تشویق قرار می گیرد که با مهندسی ژنتیک روی مقاومت های دیده شده و موجود کار کرده شود. دانش در سطح مولکولی باید تعمیم و همگانی گردد. راه کار های انتخاب یکی از آن موارد است. مقاومت را باید از چند جنبه تثبیت و مطمئن ساخت (راه کار هر می یا کله قندی). زمینه های مورد نیاز کنونی می توان به بیماری های ویروسی خاکزاد درجو، فیتوفتورا در سیب زمینی، فوزاریوم در گندم، سختینه (*Claviceps purpurea*) در تلخه یا چاودار اشاره کرد. یکی از جدید ترین مشکلات بی اثر شدن حشره کش ها در مبارزه با سوسک گرده خوار منداب (*Meligethes aeneus*) است که سبب کاهش 70% محصول در سال 2006 در آلمان شد.

کاشت فشرده منداب و کم کردن فاصله آیش درزراعت آن به سه سال، از دیگر خواسته های کشاورزان است. احتمال می رود در آینده در بعضی از مزارع مناسب، تناوب گندم زمستانی هر دو سال دنبال شود. در مورد تغییر تناوب در منداب و احتمال بروز آفات ناشی از آن هم باید تحقیق شود. انگیزه بعدی تحقیق، ارقام مخصوص چغندر قند و شاید ذرت است که باید مقاوم به علف کش ها باشند. زیرا ذرت و چغندر های مقاوم به علف کش ها هم از نظر محیط زیست و هم از نظر کاشت، مزیت زیادی دارند و می توانند استفاده از علف کش ها را بی نیاز کنند.

مخلوط کردن ارقام گیاهان زراعی برای حفظ مقاومت

در گذشته فکر مخلوط کردن ارقام گیاهان زراعی با مقاومت های متفاوت مطرح بوده است تا فشار برای ایجاد مقاومت در آفات و عوامل بیماری زا کاهش یابد. کشاورزان موفقیت این روش را در عمل نمی توانند ارزشیابی کنند، لذا باید برنامه های تحقیقاتی در این زمینه مورد توجه قرار گیرد.

توسعه پرازیت ها و بیمارگرهای طبیعی آفات

این پرسش مطرح است چرا از پرازیت ها و بیمارگرهای طبیعی در مبارزه با آفات استفاده می شود. در خیلی از مناطق آلمان موش ها از مسایل مهم و هزینه بر شده اند. مبارزه های شیمیائی ناموفق، ناگزیر راه حل های دیگری نظیر استفاده از بیمارگرهای طبیعی برای مبارزه با موش ها را امکان پذیری سازد. کپه (hawk) های خاک که موشها درست می کنند ناشی از کم شخمی نیست بلکه در اثر کمی باران است. عدم شخم زدن زمین برای صرفه جوئی در مصرف آب، راه حل مناسبی نمی باشد.

تشخیص

تشخیص در تک تک بوته ها به گذشته تعلق دارد. این گونه تشخیص ها نا مطمئن و نماینده کل مزرعه نیست. از طرفی قبل از این که نشانه های کامل بیماری ظاهر شود، معمولاً با آن مبارزه می شود. باید راه های تشخیص از فضا و یا از کنار مزرعه انتخاب شود. نوع بیماری و درجه آلودگی نیز باید مشخص گردد. در آینده ترسیم نمودار (simulation) و نحوه برآورد بیماری ها باید در محل انجام شود. این آمار برداری می تواند بر اساس یادداشت های تخصصی مدیریت مزرعه و مسئول اجرای

سیستم عملیات سم پاشی تنظیم و تکمیل شود. مدیریت مزرعه نمودار فرضی (simulation) و تشخیص از راه دور را با نمونه برداری تصادفی و بازدید از مزرعه با هم ادغام می کند. غیر از آن باید با پردازش های رایانه ای میزان بیماری ها را مشخص کرد و راه های مبارزه را توسعه داد و مبارزه در قطعات انتخابی در مزرعه (specific area part) را انجام داد. مبارزه در قطعات انتخابی در مزرعه در مورد بیماری هایی که به صورت اپیدمی در نمی آیند مانند بیماری های ریشه ای غلات یا سایر بیماری های خاکزاد، قابل اجرا است. روزبه روز به اهمیت، کارکرد در قطعات انتخابی در مزرعه اضافه می شود، مثلاً کود پاشی P, N, K, CaO فقط در فواصل ردیف های مزرعه، زیرا این راه کار در سطح کلی مزرعه ضروری و عملی نیست.

سموم دفع آفات

توسعه سموم قارچ کش های سیستمیک با اثر درازمدت، در مورد دانه های بذری، غلات و منداب مورد بحث بوده، اما پی گیری نشده است. انگیزه این توسعه از نظر کشاورزان، کاربرد درازمدت این قارچ کش ها و مناسب بودن آن ها با محیط زیست است. رسیدن به این هدف می تواند از برنامه های تحقیقاتی باشد.

جدول تحقیقات

روزبه روز بر تعداد ثبت تولیدات کشاورزی و فرایند های کیفیت افزوده می شود. در آینده به وسعت آن ها باز هم افزوده خواهد شد. باید یک لیست و جدول عملی برای سموم دفع آفات تهیه و توسعه داده شود که سموم جدیدی که مجوز می گیرند به صورت خودکار سالیانه وارد آن لیست شوند. انستیتوی بیولوژی فدرال آلمان (BBA) که دارای چنین لیست است می تواند در آینده مبتکر این مورد باشد.

چکیده و دیدگاه آینده

خواستار کشاورزان که کار عملی می کنند مورد جدیدی نیست. اما مسئله مهم، نگرانی از پیچیده گی های ساختار تحقیقاتی است که به میزان کافی نیست و با هم هماهنگی ندارد. در این مبحث سه بخش مختلف تحقیقاتی مورد خطاب بود؛

1- تحقیقات در سطح مولکولی برای پیدا کردن ارتباط مقاومت در گیاهان

- 2- تحقیقات در سطح تشکیلاتی برای پیدا کردن و توسعه نرم افزار، بمنظور شناسائی و ترسیم نمودار زنده از بیماری ها و هدایت این داده ها به تشکیلات برای تصمیم گیری
- 3- تحقیقات در مورد حل مشکلات فناوری وسایل مورد نیاز در کشاورزی مدرن