نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹، ص ۵۲-۴۳

Journal of Plant Protection
Vol. 24, No. 1, Spring 2010, p. 43-52

جداسازی گونه *Meloidogyne cruciani* از گلخانه‌های خیار منطقه جیرفت و بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای آن با استفاده از نشانگر RAPD-PCR

حمیدرضا رفیعی[1*] – عصمت مهدیخانی مقدم[2] – موسی نجفی نیا[3]

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۱۴
تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۱۲

چکیده

به منظور شناسایی نماتدهای ریشه گرهی خیار در گلخانه‌های منطقه جیرفت، طی سال‌های ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷، تعداد ۳۵ نمونه خاک و ریشه آلوده به نماتدهای ریشه گرهی از ۱۰ گلخانه خیار مربوط به سه منطقه عمده خیار کاری منطقه جمع آوری و از نمونه خاک برای استخراج نرها و از ریشه‌های آلوده جهت استخراج ماده‌های بالغ، لارو سن دوم و تکثیر نماتد در گلخانه استفاده شد. با توجه به مشخصات ریخت شناسی و ریخت سنجی لاروهای سن دوم، نرها و شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده ها، دو گونه *Meloidogyne javanica* و *Meloidogyne cruciani* شناسایی گردید. به منظور مطالعات مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای *M. cruciani*، گونه مذکور در گلخانه تکثیر شد. پس از خالص سازی و تکثیر نماتد بر روی رقم حساس گوجه فرنگی (Rutgers) در گلخانه، تخم‌ها و لاروهای سن دوم هر ریشه جدا و به عنوان یک جمعیت در نظر گرفته شد. سپس استخراج DNA هرجمعیت به روش سیلوا و همکاران انجام و پس از تعیین کمیت و کیفیت DNA، جهت بررسی تنوع در کل ژنوم، تکنیک RAPD-PCR با ده آغازگر ده نوکلئوتیدی و با استفاده از کیت‌های Bioneer's Accupower^{TM}PCR PreMixes انجام گرفت. پس از انجام واکنش، فرآورده‌های PCR بروی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و چندشکلی‌های بوجود آمده از DNA هر جمعیت در این تکنیک، بر اساس وجود یا عدم وجود باند به صورت داده‌های صفر و یک در اکسل وارد و سپس ماتریس تشابه برمبنای ضریب شباهت Dice محاسبه شد و جهت بررسی تنوع بین جمعیت ها، ماتریس تشابه به ماتریس فاصله ژنتیکی تبدیل و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA در نرم افزار NTSYS انجام و دندروگرام مربوطه رسم گردید. در سطح تشابه ۷۲ درصد جمعیت‌ها در دو گروه قرار گرفتند و با توجه به نتایج کلی، نشانگر RAPD توانست ۹۱-۷۱ درصد تشابه و ۲۹-۸ درصد تفاوت بین جمعیت‌های گونه مورد مطالعه نشان دهد.

واژه‌های کلیدی: *Meloidogyne cruciani* ، RAPD-PCR، تنوع ژنتیکی، خیار، جیرفت

مقدمه

خیار یکی از سبزیجاتی است که در ایران سطح زیر کشت قابل توجهی را به خود اختصاص داده است. طبق آمار فائو در سال ۲۰۰۵، ایران با تولید ۱۴۰۰۰۰۰ تن خیار حدود ۳/۳ درصد از تولید جهانی را در اختیار داشته که از سطحی معادل ۸۳۰۰۰ هکتار بدست می‌آید. ایران بعد از چین و ترکیه مقام سوم جهانی را به خود اختصاص داده است (۳). بر اساس آمارنامه کشاورزی سال ۱۳۸۵، سطح زیر کشت این محصول در ایران ۸۲۳۵۰ هکتار و بیشترین سطح زیر کشت متعلق به منطقه جیرفت و کهنوج بوده که در سطحی معادل ۲۱۰۰۰ هکتار کشت می‌شود که حدود ۲۷ درصد از سطح کل کشور را شامل می‌شود (۲). این گیاه در شرایط آب و هوایی مختلف در فصول مناسب به صورت آزاد و در پاییز و زمستان درون گلخانه‌های پلاستیکی کشت می‌شود. با توجه به شرایط آب و هوایی مناطق مختلف ایران و هم چنین شرایط خاص گلخانه ها، این گیاه مورد حمله عوامل مختلف بیماری زا از جمله نماتدهای ریشه گرهی قرار می‌گیرد. نماتدهای ریشه گرهی متعلق به جنس *Meloidogyne* Goeldi , 1887 انگل‌های اجباری بسیاری از گیاهان با ارزش اقتصادی بالا در تمام مناطق جهان هستند و بیش از هزاران گونه گیاهی را مورد حمله قرار می‌دهند. این جنس اولین بار توسط برکلی در سال ۱۸۸۵ از گلخانه‌های خیار انگلستان معرفی شد (۱۷). گونه‌های این جنس انگل‌های داخلی ساکن و اجباری هستند که روی

۱و۲ – به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: rafieehamidreza@gmail.com)
۳ – عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی جیرفت و کهنوج

Archive of SID
www.SID.ir

تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی به سر می‌برند و دامنه میزبانی آنها بیش از ۳۰۰۰ گونه گیاهی را شامل می‌شود (۱۰). گرچه تاکنون خصوصیات بیش از ۹۰ گونه از جنس *Meloidogyne* شرح داده شده است، اما چهار گونه *M. javanica* ، *M. incognita* ، *M. arenaria* و *hapla* از نظر اقتصادی بیشترین اهمیت را دارا هستند (۱۸). بیماری ریشه گرهی ناشی از گونه‌های جنس *Meloidogyne* مهمترین بیماری خیار در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان است (۲۱ و۲۲). نماتدهای ریشه گرهی بسته به گونه نماتد، نوع و سن گیاه گال‌های متفاوتی برروی ریشه خیار ایجاد می‌کنند. گیاهان خانواده کدو و خیار نسبت به این نماتدها حساس بوده و گال هایی بزرگ و با شکل‌های نامنظم برروی ریشه آنها تشکیل می‌شود (۱۸). اخیانی و همکاران در سال ۱۳۶۳ طی بررسی گونه‌ها و نژادهای نماتدهای ریشه گرهی در ایران، گونه‌های *M. javanica* (از مناطق اردستان، اصفهان، لنجانات، قصر شیرین و اهواز)، *M. incognita* (از اردستان و حسن رود رشت) و نژاد ۲ گونه *M. arenaria* (نیز از حسن رود رشت) را روی خیار شناسایی و گزارش کردند (۱). باروتی درسال ۱۳۷۶ در شناسایی فون نماتدهای گیاهی آذربایجان شرقی، اردبیل و مغان، علاوه بر چندین نماتد دیگر گونه *M. javanica* را از روی خیار (در منطقه خلخال و مشکین شهر) گزارش کرد (۴). مهدیخانی مقدم و همکاران در سال ۱۳۸۲ در بررسی و شناسایی گونه‌های جنس *Meloidogyne* در ایران، گونه *M. cruciani* را از روی ریشه‌های کدوحلوایی، حسن یوسف و گوجه فرنگی در کرج و مشهد، هم چنین از روی ریشه‌های خیار در هشتگرد، میخک در محلات و زیتون در رودبار جمع آوری و برای اولین بار از ایران گزارش نمودند (۵). برای شناسایی و تفکیک گونه‌ها و نژادهای جنس *Meloidogyne* علاوه بر خصوصیات ریخت شناسی، ریخت سنجی، سیتولوژیک، اکولوژیک و بیماری زایی برروی میزبان‌های افتراقی، از روش‌های مولکولی RAPD-PCR ، RFLP-PCR وSCAR-PCR نیز استفاده می‌شود. با روش‌های مولکولی می‌توان تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف یک گونه را نیز مشخص کرد (۱۱ و ۲۳). پاورز و هریس در سال ۱۹۹۳ با استفاده از PCR پنج گونه *M. incognita* ، *M. arenaria* ، *M. javanica* ، *M. hapla* و *M. chitwoodi* را شناسایی کردند. گونه *M. incognita* و *M. javanica* هر دو تولید باند ۱/۷ کیلو بازی، گونه *M. arenaria* باند۱/۱ کیلوبازی و گونه‌های *M. chitwoodi* و *M. hapla* هر دو تولید باند ۰/۵۲ کیلو بازی کردند. برای متمایز کردن *M. incognita* و *M. javanica* محصول واکنش PCR را در معرض آنزیم برشی *Hinf* I قرار دادند. قطعه ۱/۷ کیلوبازی در گونه *M. incognita* به سه قطعه ۱، ۰/۴ و ۰/۳ کیلوباز و در گونه *M. javanica* به دو قطعه ۱ و ۰/۷ کیلوباز برش خورد، برای تفکیک دو گونه *M. chitwoodi* و *M. hapla* محصول واکنش PCR را در معرض آنزیم *Dra* I قرار دادند که در مورد *M. hapla* دو قطعه ۲۹۰ و ۲۳۰ جفت باز و در *M. chitwoodi* سه قطعه ۲۹۰، ۲۳۰ و ۱۰۰ جفت باز تولید شد و از این طریق گونه‌ها را از هم تفکیک کردند (۱۶). سنیز در سال ۱۹۹۳ DNA چهار گونه عمده *Meloidogyne* را با استفاده از روش RAPD-PCR مورد بررسی قرار داد. در این تحقیق از ۲۲ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی استفاده شد. آغازگر OPA-01 چندشکلی واضحی را در بین چهار گونه نشان داد. با استفاده از این آغازگر بعضی از باندهای تکثیر شده برای هر گونه از نظر اندازه متفاوت بودند به طوریکه در *M. incognita* باندهای ۵۴۰ و ۱۰۰۰ جفت باز، در *M. arenaria* باند ۵۸۰ جفت باز، در *M. javanica* باندهای ۵۸۰ و ۶۶۰ جفت باز، در *M. hapla* باندهای ۸۵۰، ۱۱۰۰، ۱۵۵۰ جفت باز را تکثیر کرد، در حالیکه بقیه آغازگرها تنها یک، دو یا سه گونه را تفکیک کردند (۸). فارگت و همکاران در سال ۱۹۹۷ تنوع ژنتیکی بین گونه‌های جنس *Meloidogyne* و جمعیت‌های داخل یک گونه در مناطق گرمسیری را با استفاده از روش RAPD مورد بررسی قرار دادند. در گونه *M. arenaria* با اینکه نمونه‌های جمع آوری شده از مناطق جغرافیایی یکسان بودند، بیشترین تنوع درون گونه‌ای مشاهده شد. ولی تنوع در گونه *M. incognita* و *M. javanica* کم بود، علیرغم اینکه نمونه‌ها از مناطق جغرافیایی متفاوت جمع آوری شده بودند (۱۱). زیلسترا و همکاران در سال ۲۰۰۰ جهت تعیین ترادف‌های مشخص از DNA گونه‌های *M. incognita*، *M. javanica* و *M. arenaria* و هم چنین طراحی آغازگرهای اختصاصی از روش RAPD-PCR استفاده کردند و با استفاده از ۱۲ جفت آغازگر، DNA جمعیت‌های مختلف سه گونه مذکور را بررسی کردند. همه آغازگرها تولیدات تکثیری خوب و الگوهای باندی متفاوتی برای این سه گونه ایجاد نمودند. از بین این ۱۲ جفت آغازگر، سه جفت آغازگر OPA-12، OPA-06 و OPA-01 به ترتیب اختصاصی گونه‌های *M. arenaria* ، *M. incognita* و *M. javanica* بوده و آنها را به خوبی شناسایی و از هم تفکیک کردند (۲۳). فوری و همکاران در سال ۲۰۰۱ گونه‌های نماتد ریشه گرهی در آفریقای جنوبی را شناسایی و با استفاده از تکنیک‌های SCAR-PCR و ITS-PCR آنها را از یکدیگر تفکیک نمودند که تکنیک SCAR-PCR توانست موقعیت گونه‌ها را به خوبی مشخص کند (۱۲). دونگ و همکاران در سال ۲۰۰۱ جهت طراحی و تولید آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی گونه‌های *M. arenaria*، *M. hapla*، *M. incognita* و *M. javanica* از روش RAPD-PCR استفاده کردند. آنها ۲۶ جمعیت مختلف از کشورهای اروپایی و آفریقایی را توسط ۱۲۰ آغازگر تصادفی مورد بررسی قرار دادند. چندشکلی‌های بدست آمده بین این جمعیت‌ها را بررسی نمودند و سپس باندهای تخصصی برای هرگونه را کلون و تعیین توالی کردند و بر اساس توالی‌های بدست آمده

Archive of SID

www.SID.ir

آغازگر اختصاصی گونه تعیین گردید (۹). تساروا و همکاران در سال ۲۰۰۳ جهت شناسایی اختصاصی گونه *M. incognita* از دیگر گونه‌های این جنس، از آغازگر ۲۰ نوکلئوتیدی اختصاصی گونه استفاده کردند. بعد از انجام واکنش PCR ، تولیدات تکثیری بر روی ژل آگارز ۱درصد، الگوی باندی ۵۰۲ جفت بازی را در جمعیت‌های مختلف *M.incognita* ایجاد کردند (۱۴). درایران، مهدیخانی مقدم و همکاران در سال ۱۳۸۵ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه و با روش PCR-RFLP جمعیت‌های مختلف دو گونه *M. javanica* و *M. incognita* را مورد مقایسه قرار دادند. پس از انجام واکنش قطعات تکثیری با آنزیم‌های محدود کننده *Alu* I، *Dra* I و *Hinf* I برش داده شد. دو آنزیم محدود کننده *Alu* I و *Dra* I هیچ گونه برشی در طول قطعه DNA تکثیر شده ایجاد نکردند اما آنزیم *Hinf* I در جمعیت‌های *M. javanica* قطعه ۱/۷ کیلوباز را به دوقطعه ۱ و ۰/۷ کیلوباز و در جمعیت‌های *M. incognita* قطعه ۱/۷ کیلوباز را به سه قطعه ۱، ۰/۴ و ۰/۳ کیلو برش داد و تفاوتی بین جمعیت‌های مختلف هر گونه مشاهده نشد (۶). عسگریان و همکاران در سال ۲۰۰۶ جمعیت‌های مختلف گونه *M. javanica* جمع آوری شده از روی درختان پسته کرمان را با روش RAPD-PCR مورد مطالعه قرار دادند. از میان ۳۰ آغازگر تصادفی مورد استفاده، ۱۰ آغازگر چندشکلی خوبی را بین جمعیت‌های مختلف *M. javanica* ایجاد کردند که بیشترین تعداد باند چندشکل مربوط به آغازگر OPA-10 و کمترین تعداد باند چند شکل مربوط به آغازگر OPC-08 بود. آنها با استفاده از تکنیک مذکور سطح تشابه ۹۱ تا ۱۰۰ درصد را در بین جمعیت‌های مختلف گونه مذکور بدست آوردند (۷). در این تحقیق هدف شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف گونه *M. cruciani* با استفاده از روش RAPD-PCR بوده است.

مواد و روش ها

در این تحقیق ۳۵ نمونه خاک و ریشه آلوده به نماتدهای ریشه گرهی از ۱۰ گلخانه خیار مربوط به سه منطقه عمده خیارکاری منطقه جیرفت جمع آوری و از نمونه خاک برای استخراج نرها و از ریشه‌های آلوده جهت استخراج ماده‌های بالغ، لارو سن دوم و تکثیر نماتد در گلخانه استفاده شد. شناسایی گونه ها بر اساس خصوصیات ریخت شناسی و ریخت سنجی شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده ها، لاروهای سن دوم و نرها بوده است. پس از تهیه برش از انتهای بدن ماده‌های بالغ، کیسه های تخم هر یک از ماده‌ها به طور جداگانه در آب مقطر قرار داده شد. پس ار تفریخ تخم ها، جهت کشتن و ثابت کردن لاروهای سن دوم از روش تکمیل شده دگریسه و سین هورست (De Grisse,1969 ., Seinhorst , 1959) استفاده گردید و پس از تهیه اسلاید از لاروهای سن دوم و شبکه کوتیکولی انتهای بدن، با استفاده از میکروسکوپ الیمپوس مجهز به لوله ترسیم، مشخصات ریخت شناسی و ریخت سنجی آنها مورد بررسی قرار گرفت. جهت خالص سازی، پتری‌های حاوی آب مقطر و یک کیسه تخم درون انکوباتور و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا اینکه تخم‌ها تفریخ و لاروهای سن دوم از تخم‌ها خارج گردید. پس از خروج حداکثر لاروها از تخم، سوسپانسیون لاروها به گلخانه منتقل و هر سوسپانسیون به طورجداگانه در مجاورت ریشه یک نشاء حساس گوجه فرنگی(رقم Rutgers) قرار داده شد. پس از ۷۰-۶۰ روز ریشه‌های گوجه فرنگی از خاک خارج و پس ازشستشو با آب ملایم و استخراج ماده‌های بالغ، لاروهای سن دوم و نرها، از شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌ها برش تهیه و هم چنین با توجه به خصوصیات لاروهای سن دوم و نرها، از خالص سازی و صحت گونه مورد نظر اطمینان حاصل گردید. پس از شناسایی گونه‌های *Meloidogyne* براساس خصوصیات ریخت شناسی و ریخت سنجی شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده ها، نرها و لاروهای سن دوم جمعیت‌های مختلف گونه *M. cruciani* روی ریشه‌های سالم گوجه فرنگی (رقم Rutgers) در گلخانه تکثیر و از نمونه‌های خالص جهت استخراج DNA استفاده شد. جهت بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف یک گونه با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD بعد از تکثیر نماتد در گلخانه، هر ریشه به عنوان یک جمعیت در نظر گرفته شد. سپس به طور جداگانه کیسه های تخم هر ریشه جدا و استخراج DNA از مخلوط تخم و لارو سن دوم هر جمعیت به روش سیلوا و همکاران (Silva *et al*., 2000) صورت گرفت (۱۹). پس از استخراج DNA، جهت ارزیابی کمی و کیفی آن، DNA حاصل در ژل آگارز یک درصد در بافر ۰/۵ X TBE الکتروفورزگردید و با اتیدیوم بروماید (۰/۵ µg/ml) به مدت ۱۵ –۱۰ دقیقه رنگ آمیزی شد و پس از شستشو با آب مقطر در دستگاه UV Transiluminator در زیر نور ماوراء بنفش عکسبرداری و مقدار DNA به طور چشمی تخمین زده شد. سپس به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر میزان DNA برحسب نانو گرم بر میکرولیتر اندازه گیری و جهت انجام آزمون RAPD-PCR غلظت DNA درتمام نمونه ها، با استفاده از آب دوبار تقطیر یکسان تنظیم شد. جهت انجام تکنیک RAPD-PCR از ده آغازگر ده نوکلئوتیدی ساخت شرکت اُپرون تکنولوژی آمریکا و کیت‌های Bioneer's Accupower^{TM}PCR PreMixes استفاده شد. توالی و اسامی آغازگرها و همچنین اجزاء و میزان مواد موجود در کیت به ترتیب در جدول ۲ و ۳ آمده است.

پس از بهینه کردن کلیه پارامترهای مربوط به واکنش PCR حجم نهایی مخلوط برای هر واکنش درآب دیونیزه ۲۰ میکرو لیتر در نظر گرفته شد. اجزاء و میزان مورد نیاز در یک واکنش ۲۰

Archive of SID

www.SID.ir

میکرولیتری با استفاده کیت مذکور در جدول ۴ آمده است.

(جدول ۱)- مشخصات جمعیت‌های مورد مطالعه از نظر محل جمع‌آوری و کد مولکولی

محل جمع آوری	شماره گلخانه	کد مولکولی
جنگل آباد	گلخانه ۱	GR1
جنگل آباد	گلخانه ۲	GR2
جنگل آباد	گلخانه ۳	GR3
جنگل آباد	گلخانه ۴	GR4
دولت آباد	گلخانه ۱	DO1
دولت آباد	گلخانه ۲	DO2
دولت آباد	گلخانه ۳	DO3
باقرآباد	گلخانه ۱	BA1
باقرآباد	گلخانه ۲	BA2
باقرآباد	گلخانه ۳	BA3

(جدول ۲)- توالی و اسامی آغازگرهای مورد استفاده در آزمون RAPD

آغازگر	توالی
OPA-08	5'- GTG ACG TAG G -3'
OPA-10	5'- GTG ATC GCA G -3'
OPA-13	5'- CAG CAC CCA C -3'
OPA-17	5'- GAC CGC TTG T -3'
OPB-11	5'- GTA GAC CCG T -3'
OPB-17	5'- AGG GAA CGA G -3'
OPC-08	5'- TGC ACC GGT G -3'
OPE-18	5'- GGA CTG CAG A -3'
OPP-17	5'- TGA CCC GCC T -3'
OPAD-10	5'- AAG AGG CCA G -3'

(جدول ۳)- اجزاء و میزان مواد موجود در کیت

Component	20 µl reaction
Taq DNA Polymerase	1 U
Each: dNTP(dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	250 µM
Tris-HCL(PH 9.0)	10 mM
KCL	30 mM
MgCL2	1.5 mM
Stabiilizer and tracking dye	

(جدول ٤)- میزان مواد مورد نیاز برای انجام RAPD-PCR با استفاده از کیت

مواد	غلظت	مقدار در یک واکنش
Genomic DNA	25 ng/µl	1.5 µl
Primer	10 Pmole	1 µl
Distilled water		17.5 µl
Total		20 µl

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در دستگاه ترموسایکلر مدل Biometra (ساخت شرکت آلمان) با برنامه حرارتی زیر انجام شد (جدول ۵).

(جدول۵)- برنامه حرارتی مورد استفاده در تکنیک RAPD

مرحله	حرارت (°C)	زمان	تعداد سیکل
Initial denaturation	۹۴	5 min	1
Denaturation	۹۴	1 min	40
Annealing	۳۵	1 min	40
Extention	۷۲	2 min	40
Final extention	۷۲	5 min	1

عمل PCR حداقل دو بار تکرار و در کنار نمونه‌ها نیز از شاهد منفی جهت کنترل آلودگی‌های PCR استفاده گردید. پس از انجام واکنش، فرآورده‌های PCR به همراه سایز مارکر نردبانی 1kb (1kb DNA ladder lambada) برروی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE 1x به مدت سه ساعت و با ولتاژ ثابت ۷۵ الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (۰/۵ µg/ml) به مدت ۱۵ دقیقه و شستشو با آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه، در دستگاه UV Transiluminator عکسبرداری شد. تصاویر تهیه شده از ژل‌های الکتروفورز محصولات PCR، که در آن قطعات تکثیر یافته توسط هر آغازگر به صورت باندهایی از یکدیگر تفکیک شده بودند، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای ایجاد ماتریس شباهت بین جمعیت ها، وجود و یا عدم وجود هریک از باندها به صورت داده‌های صفر و یک {وجود باند (۱) و عدم وجود باند (۲)}و در نرم افزار اکسل وارد و ماتریس تشابه بر مبنای ضریب شباهت Dice محاسبه گردید. برای بررسی تنوع بین جمعیت ها، ماتریس تشابه به ماتریس فاصله ژنتیکی تبدیل و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA در نرم افزار NTSYS$_{PC}$ V-2.02 انجام گرفت و نتایج تجزیه خوشه‌ای در یک دندروگرام خلاصه شد.

نتایج و بحث

الف) شناسایی *Meloidogyne cruciani*

مشخصات شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده ها، مشخصات ریخت شناسی و ریخت سنجی ماده، نر و لاروهای سن دوم مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر وجود گونه *Meloidogyne javanica* که گونه غالب در گلخانه‌های خیار منطقه بود، گونه *Meloidogyne cruciani* نیز مشاهده گردید. مشخصات ریخت سنجی گونه *M. cruciani* در جدول ۶ آمده و مشخصات ریخت شناسی آن به شرح زیر می‌باشد.

ماده- گلابی شکل تا کروی و سفید رنگ، بدون برجستگی

Archive of SID

www.SID.ir

انتهای بدن (Protuberance)، گردن بلند و خمیده، سر نسبت به بدن کمی فرورفته، دارای یک یا دو شیار عرضی، استایلت قوی با گره‌های انتهایی گرد، قسمت مخروطی استایلت هفت تا ۱۰ میکرومتر، فاصله محل ریزش غده پشتی مری از گره‌های استایلت ۳/۲ تا پنج میکرومتر، فاصله منفذ دفعی – ترشحی ازناحیه سر دو برابر طول استایلت، حباب میانی بزرگ به ابعاد ۴۵–۴۰×۳۸–۳۲ و با دریچه مشخص، ابعاد دریچه حباب میانی مری ۱۸×۱۳ میکرومتر، غده‌های انتهایی مری به صورت غده‌های مجزا و ابتدای روده را نیز می‌پوشانند. شبکه کوتیکولی انتهای بدن دارای نقاط زیرکوتیکولی در کناره‌های جانبی و عقبی مخرج، شیارهای کمان پشتی عمیق، موج دار و گاهی اوقات شکسته شده است. خطوط سطوح جانبی بدن تا قسمتی از شبکه کوتیکولی انتهای بدن کشیده شده ولی ادامه ندارد. فاسمیدها مشخص و با فاصله ۳۶–۲۵ میکرومتر از یکدیگر، لب‌های فرج کمی دندانه دار و حاشیه‌های آن دارای شیارهای ظریف، انتهای دم نامشخص که توسط شیارهای بریده شده شبکه کوتیکولی انتهای بدن پوشیده شده است.

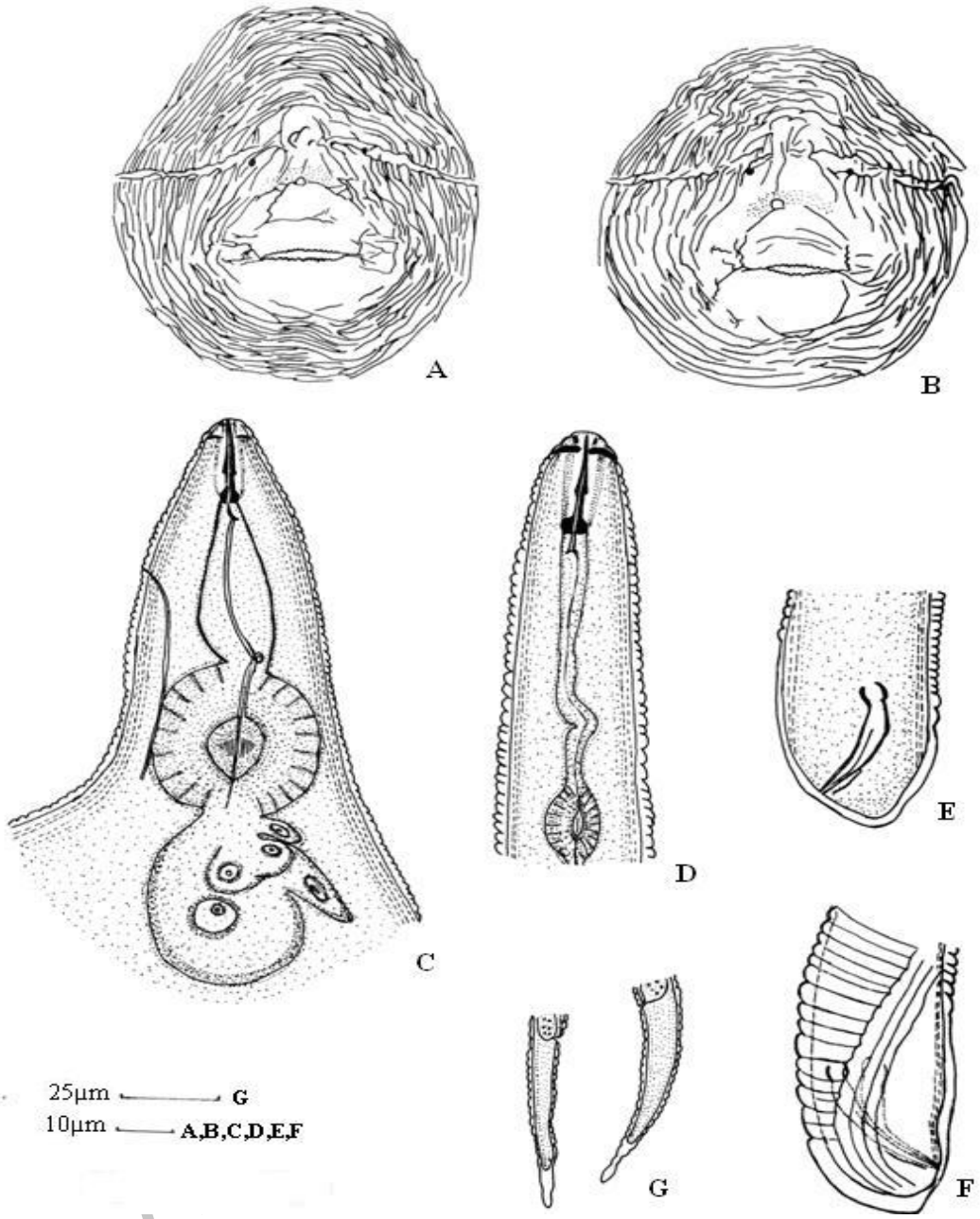
نر– کرمی شکل و بلند که دو انتهای بدن آنها گرد می‌باشد. سر نسبت به بدن فرورفته، دارای دو شیار عرضی، طول سر ۵ تا ۷ و عرض آن ۱۳– ۱۱ میکرومتر، شبکه کوتیکولی سر مشخص، استایلت قوی با گره‌های گرد، قسمت مخروطی استایلت ۱۴– ۱۲ میکرومتر، فاصله محل ریزش غده پشتی مری ازگره‌های استایلت شش تا هشت میکرومتر است. غده‌های مری مشخص و طول مری ۱۹۶– ۱۶۵ میکرومتر است. منفذ دفعی– ترشحی مشخص و فاصله آن از ناحیه سر ۱۴۰–۱۳۵ میکرومتر است.

(جدول ٦)– مشخصات ریخت سنجی ماده‌های بالغ، شبکه کوتیکولی انتهای بدن، نرها و لاروهای سن دوم گونه *Meloidogyne cruciani*

پارامترها	ماده ها	نرها	لاروهای سن دوم
n	۱۲	۸	۱۳
a	۱/۷–۲	۴۳/۸–۴۴/۶	۲۹/۰۶–۳۰/۳
b	–	–	۴/۸–۶/۱
b'	–	–	۲/۲–۲/۵
c	–	–	۹/۱–۹/۳
c'	–	–	۴/۴۵–۴/۷۱
Body length	۵۰۰–۷۰۰	۱۲۵۰–۱۳۶۰	۴۱۰–۴۶۵
Body with	۳۲۰–۶۲۵	۲۸–۳۱	۱۳/۵–۱۶
Neck length	۱۴۰	–	–
Stylet length	۱۳–۱۵	۲۱/۵–۲۲	۱۱–۱۲
Stylet knob height	۲/۲–۲/۵	۲/۹–۳/۱	۱/۲–۱/۴
Stylet knob width	۳/۹–۴/۲	۴/۸–۵	۲/۱–۲/۳
Dorsal esophageal gland orifice to base of stylet knobs	۳/۳–۳/۵	۳/۵–۴	۳/۲–۳/۶
Anterior end to excretory pore	۳۵–۴۳	–	–
Anterior to center of median bulb	۷۵–۸۷	–	–
Vulva slit length	۲۱–۲۳	–	–
Distance vulval slit to anus	۱۶–۱۹	–	–
Interphasmidial distance	۲۰–۲۳	–	–
Spicule length	–	۲۹–۳۰	–
Gubernaculum	–	۷–۸/۲	–
Tail length	–	–	۴۵–۵۰
Anal body width	–	–	۱۰/۱–۱۰/۶
Hyalin length	–	–	۱۲–۱۳/۵

Archive of SID

www.SID.ir



(شکل ۱)- ماده ، نر و لارو سن دوم گونه *Meloidogyne cruciani* : A-B : شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده بالغ؛ C : بخش جلویی بدن ماده؛ D : بخش جلویی بدن نر، E-F : دم و اسپیکول در نر؛ G : دم در لارو سن دوم

همیزونید به اندازه ۳/۵ شیار عرضی جلوتر از منفذ دفعی–ترشحی قرار دارد. سطوح جانبی بدن دارای چهار شیار طولی است که در ناحیه جلوی بدن تا نزدیک گره‌های استایلت به صورت دو شیار و از ناحیه حباب میانی مری به صورت چهار شیار دیده می‌شود و تا انتهای دم کشیده شده اند. دم کوتاه بدون بورسا، اسپیکول خمیده و در انتها گرد، به طول ۳۵–۳۰ میکرومتر، سطح داخلی گوبرناکولوم دارای دندانه‌های ظریف، فاسمیدها ۵/۹ میکرومتر جلوتر از منفذ دفعی– تناسلی قرار دارند.

لاروهای سن دوم- کرمی شکل، سر نسبت به بدن کمی فرورفته و با یک شیار عرضی مشخص، طول سر سه میکرومتر و عرض آن پنج تا هفت میکرومتر، استایلت قوی و قسمت مخروطی آن ۹ تا ۱۰ میکرومتر، گره‌های استایلت گرد و متمایل به طرف عقب بدن، غده‌های انتهای مری بلند، حباب میانی مری مشخص به ابعاد ۹–۷ × ۱۶–۱۲ میکرومتر و دارای دریچه میانی مشخص و طول مری

www.SID.ir

۱۸۳– ۱۶۲ میکرومتر است. سطوح جانبی بدن دارای چهار شیار طولی که در ناحیه سر تا گره‌های استایلت به صورت دو شیار طولی و در ناحیه حباب میانی مری به صورت چهار شیار طولی دیده می‌شوند. دو شیار طولی داخلی نزدیک به دم خاتمه یافته و دو شیار طولی خارجی تا نزدیک به انتهای دم کشیده می‌شود. دم مخروطی شکل، انتهای دم دارای فرورفتگی‌های نامنظم که گاهی به صورت بریدگی مشاهده می‌شوند. شیارهای پوست در ناحیه دم نامشخص، طول دم ۵۳–۴۱ میکرومتر و طول بخش کوتیکولی انتهای دم (هیالین) ۱۵–۱۰ میکرومتر می‌باشد.

گونه *M. cruciani* با داشتن نقاطی در اطراف مخرج در قسمت شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌ها از گونه‌های دیگر این جنس متمایز می‌گردد. گونه دیگری که دارای نقاطی در شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌ها می‌باشد *M. hapla* است، اما در گونه اخیر نقطه‌ها خیلی مشخص تر و در انتهای دم و در سطح کوتیکول وجود دارند، در حالیکه در گونه مورد بحث نقاط خیلی ظریف تر، در اطراف مخرج و به صورت زیر کوتیکولی دیده می‌شوند. شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌های گونه مورد مطالعه، در داشتن خطوط سطوح جانبی مشخص، شبیه گونه *M. javanica* می‌باشد. با این تفاوت که گونه *M. cruciani* ضمن دارا بودن نقاطی در ناحیه مخرج، خطوط سطوح جانبی بدن به اندازه گونه *M. javanica* گسترش نمی یابد. هم چنین طول بدن لارو سن دوم در این گونه از گونه‌های دیگر این جنس بلندتر است. طول اسپیکول و فاصله محل ریزش غده پشتی مری از زیر گره‌های استایلت نیز در نرهای گونه مورد بحث بیشتر از گونه *M. javanica* می‌باشد (طول اسپیکول در *M. jvanica* ۲۵ میکرومتر و فاصله محل ریزش غده پشتی مری از زیر گره‌های استایلت در گونه مذکور ۲/۵ تا سه میکرومتر). این مشخصات و تفاوت‌های گونه مورد بحث را مشخص و از سایر گونه‌های مشابه متمایز می‌کند. مشخصات ریخت شناسی و ریخت سنجی گونه مزبور با شرح اصلی گونه *M. cruciani* (Garcia-Martinez *et al*., 1982) نیز مقایسه گردید و این مشخصات با شرح اصلی گونه مطابقت نشان می‌دهد. میزبان اصلی این گونه گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) می‌باشد. این گونه اولین بار توسط گارسیا – مارتینز و همکاران در سال ۱۹۸۲ از روی ریشه‌های گوجه فرنگی در جزایر ویرجینای آمریکا جمع آوری و توصیف شد (۱۳ و۱۴). در ایران این گونه اولین بار توسط مهدیخانی مقدم و همکاران (۱۳۸۲) از روی ریشه‌های کدوحلوایی، حسن یوسف و گوجه فرنگی در کرج و مشهد، خیار در هشتگرد، میخک در محلات و زیتون در رودبار جمع آوری و شناسایی گردید. در این بررسی گونه *M. cruciani* از روی ریشه‌های خیار در گلخانه‌های منطقه جیرفت جمع آوری گردید.

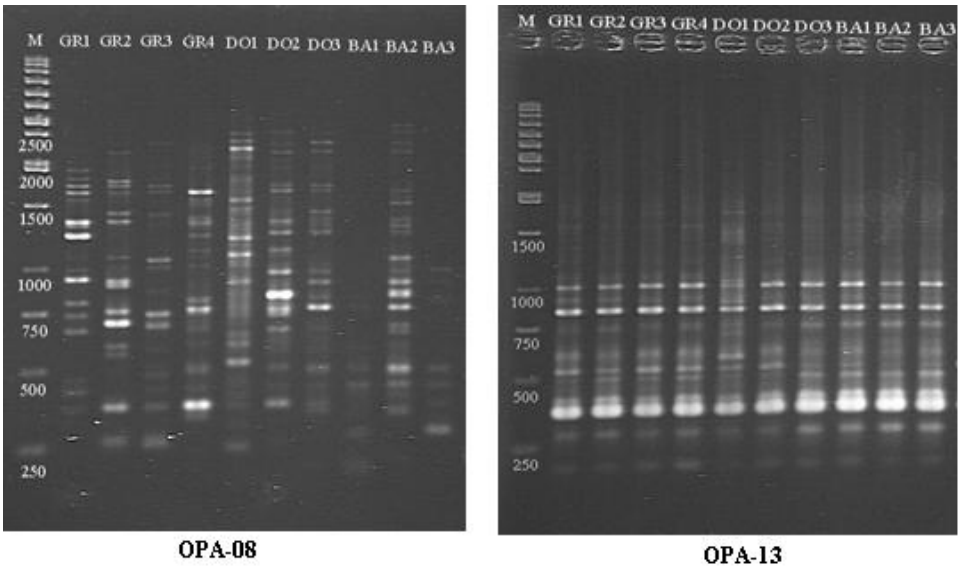
ب) تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای *Meloidogyne cruciani*

جهت انجام مطالعات مولکولی تاکنون روش‌های متعددی جهت استخراج DNA از نماتدهای انگل گیاهی ارائه شده است. به علت عدم استفاده از مواد سمی و خطرناک، وقت گیر نبودن و خلوص بالای DNA، در این تحقیق روش سیلوا و همکاران (۱۹) به کار گرفته شد و با استفاده از این روش از ۱۰ جمعیت مورد مطالعه استخراج DNA صورت گرفت. مشخصات جمعیت‌های گونه *M. cruciani* در جدول ۱ آورده شده است. در این تحقیق از بین ده آغازگر تصادفی مورد استفاده، شش آغازگر؛ OPA-08 ، OPA-10 ، OPA-17 ، OPA-13 ، OPC-08 و OPE-18 بهترین چندشکلی را بین ۱۰ جمعیت *M. cruciani* ایجاد نمودند. بیشترین تعداد باند چندشکل را آغازگر OPA-08 (شکل ۲) با تعداد ۲۲ باند و کمترین تعداد باند چندشکل را آغازگر OPA-10 با تعداد دو باند تولید نمودند. هیچ کدام از این شش آغازگر به تنهایی قادر به مشخص نمودن تمام جمعیت‌ها به عنوان ژنوتیپ‌های متفاوت نبوده و تنها پرایمر OPA-08 که تا حدی توانست این تفاوت را نشان دهد. با استفاده این شش آغازگر در مجموع ۶۰ باند برای ۱۰ جمعیت بدست آمد که توانست پلی مورفیسم DNA این ده جمعیت را تا حدودی نشان دهد. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از واکنش RAPD-PCR در بین ده جمعیت مختلف گونه *M. cruciani* بر اساس وجود یا عدم وجود باند، به صورت داده‌های صفر و یک در اکسل وارد شد و با استفاده از روش UPGMA و ضریب شباهت Dice، در نرم افزار NTSYS تجزیه خوشه‌ای انجام و دندروگرام مربوط به نتایج تجزیه خوشه‌ای رسم گردید (شکل ۳). جمعیت‌های گونه *M. cruciani* بر اساس واکنش RAPD در سطح شباهت ۷۲ درصد به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول (I) با درصد فراوانی ۸۰ درصد در بر گیرنده جمعیت‌های GR1، GR2 ، GR3 ، GR4 ، DO1 ، DO2 ، DO3 و BA2 جمع آوری شده از گلخانه‌های منطقه‌های جنگل آباد ، دولت آباد و یک گلخانه از باقر آباد بود. گروه دوم (II) با درصد فراوانی ۲۰ درصد در برگیرنده جمعیت‌های BA1 و BA3 جمع آوری شده ازگلخانه‌های باقر آباد بود. میزان شباهت جمعیت‌های گروه اول ۷۴ درصد و گروه دوم ۷۳ درصد و هم چنین وجه اشتراک و شباهت این دو گروه نسبت بهم ۷۱ درصد تعیین شد. همان طور که انتظار میرفت از آن جایی که دو منطقه جنگل آباد و دولت آباد از نظر موقعیت جغرافیایی نسبت به منطقه باقر آباد به هم نزدیک ترند، جمعیت‌های این دو منطقه در یک گروه (گروه I) قرار گرفتند و جمعیت‌های منطقه باقر آباد (به جزء جمعیت مربوط به یک گلخانه از آن) در گروه دوم (گروه II) جای گرفت. گروه اول (I) خود شامل دو زیر گروه A و B و شباهت این دو زیر گروه ۷۴ درصد است. زیر گروه A شامل دو جمعیت GR1 و GR2 است که ۹۲

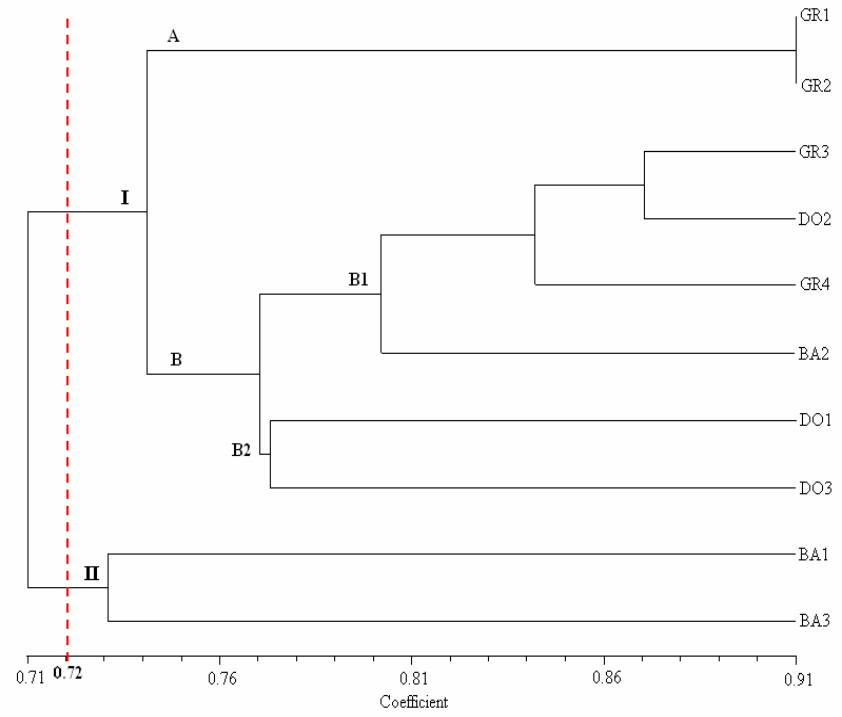
Archive of SID

www.SID.ir

درصد شباهت دارند و تنها ۸ درصد باهم تفاوت نشان مـی‌دهنـد. زیـر گروه B نیز شامل دو زیر گروه B1 و B2 مـی‌باشـد. زیـر گـروه B1 شامل جمعیت‌های GR3 ، GR4 ، DO2 و BA2 و زیر گـروه B2 شامل جمعیت‌های DO1 و DO3 است که طبق نمودار جمعیت‌های مربوط به یک گلخانـه از منطقـه بـاقر آبـاد ودولـت آبـاد در کنـار دو جمعیت از منطقه جنگل آباد جای گرفتند (زیر گروه B1) کـه حـدود ۸۰/۵ درصد شباهت دارند. در زیرگروه B2 فقط دو جمعیت مربوط به منطقه دولت آباد قرار گرفت. با توجه به نتایج کلی ، نـشانگر RAPD توانست ۹۲-۷۱ درصد تشابه و ۲۹-۸ درصد تفاوت بین جمعیت‌هـای مربوط به این سه ناحیه (جنگل آباد ، دولت آباد و باقر آباد) را نـشان دهد.



(شکل ۲)- الگوی DNA تکثیر شده با نشانگر RAPD-PCR با استفاده از آغازگرهای OPA-08 و OPA-13



(شکل ۳)- دندروگرام حاصل از نتایج واکنش RAPD

www.SID.ir

با بررسی منابع موجود، در رابطه با گونه *M. cruciani* هیچ گونه کار مولکولی صورت نگرفته است، ولی برروی گونه نزدیک (*M. javanica*) به گونه *M. cruciani* تحقیقات مشابهی به شرح زیر صورت گرفته است. سنیز در سال ۱۹۹۳ با به کار گیری ۲۲ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی نتوانست تنوع قابل توجهی را دربین جمعیت‌های مختلف گونه *M. javanica* بدست آورد. فارگت و همکاران در سال ۱۹۹۷ میزان تشابه جمعیت‌های مختلف گونه *M. javanica* مورد مطالعه را با استفاده از ۱۹ آغازگر تصادفی ۹۷/۴ درصد گزارش کرد. عسگریان و همکاران در سال ۲۰۰۶ با استفاده از ۳۰ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی سطح تشابه ۱۰۰-۹۱ درصد را در بین جمعیت‌های مختلف گونه *M. javanica* بدست آورند. در این تحقیق میزان تشابه بین جمعیت‌های مختلف گونه *M. cruciani* ۷۱ تا ۹۲ درصد بدست آمد. گرچه نشانگر RAPD-PCR تا حدودی توانست بسته به نوع ناحیه از نظر ژنتیکی بین جمعیت‌های *M. cruciani* تفاوت قایل شود ولی چنان چه از تعداد بیشتری آغازگر تصادفی استفاده شود یا از نشانگرهای مولکولی دیگر مانند AFLP نیز به صورت مکمل استفاده گردد و همچنین جمعیت‌های بیشتری از این گونه از مناطق مختلف جمع آوری و مورد بررسی قرار گیرد، نتایج بهتری بدست خواهد آمد.

منابع

۱- اخیانی ا.، مجتهدی ح. و نادری ا. ۱۳۶۳. گونه‌ها و نژادهای فیزیولوژیک نماتدهای مولد گره ریشه در ایران، نشریه بیماریهای گیاهی، ۲۰، صفحه ۵۷ تا ۷۱

۲- بی نام. ۱۳۸۵. آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی

۳- بی نام. ۱۳۸۷. معاونت امور تولیدات گیاهی

۴- باروتی ش. ۱۳۷۶. فون نماتدهای گیاهی خاک‌های زراعی آذربایجان شرقی، اردبیل و مغان، نشریه آفات وبیماریهای گیاهی، ۶۶ (۱و۲)، صفحه ۷۹ تا ۹۸

۵- مهدیخانی مقدم ع.، خیری ا.، محمدی م.، اشتیاقی ح. و اخوت م. ۱۳۸۲. معرفی سه گونه جدید از جنس *Meloidogyne* برای ایران، نشریه بیماریهای گیاهی، ۳۹، صفحه ۱۲۱ تا ۱۸۹

۶- مهدیخانی مقدم ع.، خیری ا. و محمدی م. ۱۳۸۵. مقایسه مولکولی جمعیت هایی از *Meloidogyne javanica* و *Meloidogyne incognita* در ایران با روش PCR-RFLP ، نشریه علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، سال دهم. شماره چهارم، صفحه ۴۰۵ تا ۴۱۰

7- Askarian H., Olia M., Sharifnabi B. and Mahdikhani Moghadam E. 2006. Species identification and genetic diversity of *Meloidogyne javanica* on pistachio in kerman province, Iran. Japanese Journal of Nematology, 36(2): 112(Abstract).

8- Cenis J.L. 1993. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR). Phytopathology, 83: 76-78.

9- Dong K., Dean R.A., Fortnum B.A. and Lewis S.A. 2001. Development of PCR primers to identify species of root-knot nematodes*: Meloidogyne arenaria*, *M .hapla*, *M. incognita* and *M. javanica*. Nematropica, 31(2): 271-280.

10-Devran Z. 2003. The screening of F2 plants for root-knot nematode resistance gene, Mi by PCR in tomato. Turkish Journal Agricultural, 28: 253-257.

11-Fargette M., Mcnicol J.W., Philips M.S. and Blok V.C. 1997. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPD. Fundamental and Applied Nematology, 20(2): 127-133 .

12-Fourie H., Zijlstra C. and Mcdonald A. 2001. Identification of root-knot nematode species occurring in South Africa using the SCAR-PCR technique. Nematology, 3(7): 675-680.

13-Garcia-Martinez R., Taylor A.L. and Smart G.C. 1982. *Meloidogyne cruciani* n.sp., A root-knot nematode from st.croix(U.S.Virgin Island)with observations on morphology of this and two other species of the genus. Journal of Nematology, 14(3): 292-303.

14-Garcia-Martinez R. 1982. post infection development and morphology of *Meloidogyne cruciani*. Journal of Nematology, 14(3): 332-338.

15-Hewlett T.E. and Tarjan A.C. 1983. Monograohs-Monografias synopsis of the genus *Meloidogyne* Goeldi. Nematropica, 13(1): 79-102

16-Powers T.O. and Harris T.S. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major

Archive of SID

www.SID.ir

Meloidogyne species. Journal of Nematology, 25(1): 1-6.
17-Sirca S., Urek G. and Karssen G. 2000. The incidence of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla* in slovena. Acta agriculturrae slovenia, 83(1): 15-22.
18-Sikora R.A. and Fernandez E. 2005. Nematode parasites of vegetable(plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agricultural). CAB international: 319-373.
19-Silva A.T., Peena J.C., Goulart L.R., Santos M.A. and Arantes N.E. 2000. Genetic variability among and within races of *Heterodera glycines* Ichinohe assessed by RAPD markers. Genetics and Molecular Biology, 23(2): 323-329.
20-Tesarova B., Zouhar M. and Rysanek P. 2003. Development of PCR for specific determination of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Plant Protection Science, 39(1): 23-28.
21-Walters S. 1998. Independence of the mj nematode resistance gene from 17 gene loci in cucumber. Horticultural science, 33(6): 1050-1052.
22-Walters S., Wehner T. and Barker K. 1999. Greenhouse and field resistance in cucumber to root-knot nematodes. Nematology, 1(3): 279-284.
23-Zijlstra C., Donkers-venne D. and Fargette M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assay. Nematology, 2(8): 847-853.

Archive of SID

www.SID.ir