چند شکلی آنزیمی درگونه‌های *Meloidogyne* در ایران

Enzyme polymorphism in *Meloidogyne* species of Iran

عصمت مهدیخانی مقدم*، احمد خیری و مجتبی محمدی

گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

دریافت ۱۳۸۴/۵/۱۱ پذیرش ۱۳۸۶/۲/۲۶

چکیده

چند شکلی آنزیمی در مورد سه آنزیم استراز، مالات دی هیدروژناز و سوپراکسید دیسموتاز در جمعیت‌های مختلف گونه‌های *Meloidogyne* در ایران مشخص شد. از ۹۰ جمعیت مورد مطالعه، ٦٢ جمعیت مربوطه به گونه *M. javanica* ، ۲۰ جمعیت مربوطه به گونه *M. incognita*، پنج جمعیت مربوطه به گونه *M. arenaria* و سه جمعیت *Meloidogyne* spp. تشخیص داده شد. پروتئین‌ها پس از استخراج از ماده‌های جوان تخمگذار، در ژل ناواسرشت جدا شدند. فنوتیپ‌های استراز بهترین شاخص برای تفکیک جمعیت‌های مختلف گونه‌های عمده *Meloidogyne* بودند بطوریکه جمعیت‌های *M. javanica* فنوتیپ استرازی J_3 و جمعیت‌های *M. incognita* فنوتیپ استرازی I_1 را نشان دادند فقط در یک جمعیت از گونه دوم یک نوار استرازی خیلی آهسته مشاهده شد. فنوتیپ‌های مالات دی هیدروژناز گونه خاصی را مشخص نکرد. پس از آنزیم استراز، فنوتیپ‌های سوپر اکسید دیسموتاز بالاترین ویژگی را در تفکیک گونه‌های عمده *Meloidogyne* نشان دادند. فنوتیپ A_4 منحصراً در جمعیت‌های *M. arenaria* مشاهده شد و جمعیت‌های *M. javanica* فنو تیپ N_2 را نشان دادند. در میان گونه‌های توصیف نشده *Meloidogyne* sp_3، *Meloidogyne* sp_2

* مسئول مکاتبه

Archive of SID

www.SID.ir

Meloidogyne sp_1 که از نظر شکل شبکه کوتیکولی انتهای بدن شبیه *M. incognita* بودند فنوتیپ استرازی در گونه اول J_3 در گونه دوم دارای سه نوارنا حرکت الکتروفورتیکی متفاوت از گونه اول و در گونه سوم دو نوار استرازی مشاهده شد. دو گونه اول از روی بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) در قزوین و گونه سوم از روی چغندر لبویی (*Beta vulgaris*) در کرج جمع‌آوری گردید.

واژه‌های کلیدی: چند شکلی آنزیمی، *Meloidogyne* ، استراز، مالات دی هیدروژناز، سوپراکسید دیسموتاز، ایران

مقدمه

نماتودهای مولد گره ریشه متعلق به جنس *Meloidogyne* Goeldi, 1887 گروه عمده‌ای از بیمارگرهای گیاهی هستند که اهمیت اقتصادی بالایی دارند زیرا گونه‌هایی چون *M. javanica* (Treub 1885) Chitwood 1949 و *M. incognita* (Kofod & White 1919) Chitwood 1949 تقریبا هر نوع گیاهی را در هر منطقه‌ای مخصوصا مناطق گرم و نیمه گرم مورد حمله قرار داده و به آن خسارت وارد می‌سازند. برای شناسایی و تفکیک گونه‌ها از خصوصیات مرفولوژیکی، سیتولوژیکی، اکولوژیکی و بیماریزایی بر روی میزبانهای افتراقی استفاده می‌شود. جهت تکمیل ویژگیهای فنوتیپی که بیشتر بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی، آناتومی و سایر معیارهای تاکسونومیکی تکیه دارد، روش شناسایی و تشخیص بیوشیمیایی نماتودهای مولد گره ریشه در سالهای اخیر توسعه یافته است. الکتروفورز پروتیینهای محلول سلولی، مقایسه آیزوزایمی و سرولوژی نیز به عنوان ابزار مفید در شناسایی گونه‌های *Meloidogyne* مطرح شده است. مطالعات آیزوزایمی نشان داده است که گونه‌های اصلی*Meloidogyne* را می توان از طریق پروتیین آیزوزایمی مخصوص آن گونه در ژل پلی آکریل آمید بررسی کرد (Hussey *et al.* 1972).

مطالعات بیوشیمیایی پروتئین‌های محلول و آنزیمها در ۲۰ سال اخیر موجب شد تا روشهای عملی برای تفکیک گونه‌های *Meloidogyne* ابداع گردد. بکارگیری آنزیم‌های مخصوص برای شناسایی گونه اولین بار توسط *دیکسون* و همکاران (Dickson *et al.* 1971) مورد بررسی قرار گرفت. سپس *هاسی* و همکاران (Hussey *et al.* 1972) مطالعات را دنبال

Archive of SID

www.SID.ir

کردند. از آنجایی که این مطالعات با تعداد کمی جمعیت از هر گونه انجام گرفت همبستگی بین چند شکلی آنزیمی و گونه‌های *Meloidogyne* به دست نیامد لذا پیشنهاد شد جمعیت‌های بیشتری از هر گونه مورد مطالعه قرار گیرد(Esbenshade & Triantaphyllou 1990). برگ و دالماسو(Berge & Dalmasso1975, Dalmasso & Berge 1978) جمعیت‌های بیشتری از مناطق مختلف را مورد بررسی قرار دادند. *لاسن* و همکاران(Lawson *et al*. 1984) با کاربرد روش IEF (Isoelecteric focusing) گونه‌های عمده *Meloidogyne* را بر اساس نوارهای پروتیینی تخمهای نماتد مقایسه نمودند. *اسبنشاد و تریانتوفیلو* (Esbenshade & Triantaphyllou 1985, 1990) ۲۹۱ جمعیت از ۱۶ گونه *Meloidogyne* را از ۶۵ کشور مورد مطالعه قرار دادند. استرازها به عنوان مارکرهای بیو شیمیایی برای شناسایی گونه‌های اصلی *Meloidogyne* مفید واقع شدند و در مواردی که فنوتیپ‌های آنزیمی استراز دو گونه نزدیک به هم بوده و شناسایی قطعی نباشد ژل برای آنزیم مالات دی هیدروژناز رنگ‌آمیزی می‌شود تا گونه‌ها از هم متمایز گردند. *پیز و ابرنتس* (Pais & Abrantes 1989) فنوتیپ‌های آنزیمی استراز و مالات دی هیدروژناز را در ۴۰ جمعیت از گونه‌های *Meloidogyne* مورد بررسی قرار دادند. *کارسن* و همکاران (Karssen *et al*. 1995) از فنوتیپ‌های آنزیمی مربوط به آنزیمهای استراز و مالات دی هیدروژناز جهت تفکیک گونه‌های *M. hapla* Chitwood, 1949 و *M. chitwoodi* Chitwood, 1949 استفاده نمودند. *کارسن* و همکاران (Karssen *et al*. 1998)گونه جدیدی از جنس *Meloidogyne* بنام گونه *M. duytsi* را از هلند معرفی نمودند که در شناسایی گونه مذکور علاوه بر الگوی شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌ها و خصوصیات مرفولوژیکی و مرفومتریکی لاروهای سن دوم و نرها از آنزیمهای استراز و مالات دی هیدروژناز با روشIEF استفاده شده است . امروزه در بسیاری از آزمایشگاهها از آیزوزایمها برای شناسایی نماتدهای مولد گره ریشه بطور معمول استفاده می شود. در این تحقیق هدف شناسایی گونه‌های *Meloidogyne* ایران بر اساس چند شکلی آنزیمی استراز، مالات دی هیدروژناز و سوپر اکسیددیسموتاز بوده است.

روش بررسی

دراین تحقیق آیزوزایمهای مربوط به سه آنزیم استراز، مالات دی هیدروژناز و سوپر

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- مشخصات جمعیت‌های مورد مطالعه از نظر محل جمع‌آوری نمونه، گیاه میزبان، گونه و کد مولکولی

Table 1. Characteristics of studied population in order to location, host, species and molecular code

کد مولکولی Molecular code	گونه Species	گیاه میزبان Host	محل جمع آوری نمونه Location	شماره جدایه Isolate No.
J_1	*M. javanica*	*Daucus carota*	Western Azarbaijan- Uromiea- Baderloo	1
J_2	*M. javanica*	*Caspicum annuum*	Uromiea- Baderloo	2
J_3	*M. javanica*	*Brassica oleraceae*	Uromiea- Baderloo	3
J_4	*M. javanica*	*Atriplex canescens*	Uromiea- Baderloo	4
J_5	*M. javanica*	*Portulaca oleraceae*	Uromiea- Baderloo	5
J_6	*M. javanica*	*Lycopersicum esculentum*	Uromiea- Baderloo	6
J_7	*M. javanica*	*Solanum melogena*	Uromiea- Baderloo	7
J_8	*M. javanica*	*Ocimum basilicum*	Uromiea- Baderloo	8
J_9	*M. javanica*	*Cucurbita pepo*	Uromiea- Baderloo	9
J_{10}	*M. javanica*	*Cucumis sativus*	Uromiea- Baderloo	10
J_{11}	*M. javanica*	*Amarantus graecizans*	Uromiea- Baderloo	11
J_{46}	*M. javanica*	*Lycopersicum esculentum*	Uromiea	12
J_{13}	*M. javanica*	*Fraxinus rotundifolia*	Isfahan- Delijan	13
J_{28}	*M. javanica*	*Punica granatum*	Isfahan- Delijan	14
J_{33}	*M. javanica*	*Cucumis sativus*	Birjand	15
J_{55}	*M. javanica*	*Ocimum basilicum*	Tabriz	16
J_{31}	*M. javanica*	*Lycopersicum esculentum*	Tehran- Yaftabad	17
J_{32}	*M. javanica*	*Solanum melogena*	Tehran- Yaftabad	18
J_{43}	*M. javanica*	*Solanum melogena*	Tehran- Azadegan Road	19
J_{44}	*M. javanica*	*Lycopersicum esculentum*	Tehran- Azadegan Road	20
J_{47}	*M. javanica*	*Brassica oleraceae*	Tehran	21
J_{57}	*M. javanica*	*Pistacia vera*	Rafsanjan	22

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- (ادامه) Table 1.(continued)

I_1	*M. incognita*	*Cucumis sativus*	Sabzevar	23
J_{27}	*M. javanica*	*Lycopersicum esculentum*	Shiraz	24
sp_1	*Meloidogyne sp1*	*Mellissa officinalis*	Ghazvin	25
sp_2	*Meloidogyne sp2*	*Mellissa officinalis*	Ghazvin	26
I_{15}	*M. incognita*	*Punica granatum*	Qom	27
J_{19}	*M. javanica*	*Cucumis sativus*	Karaj- Sarhadabad	28
J_{20}	*M. javanica*	*Lycopersicum esculentum*	Karaj- Kamalabad	29
J_{21}	*M. javanica*	*Lycopersicum esculentum*	Karaj- Jafarabad	30
J_{22}	*M. javanica*	*Brassica oleraceae*	Karaj- Kamalabad	31
J_{23}	*M. javanica*	*Solanum nigrum*	Karaj- Kamalabad	32
J_{24}	*M. javanica*	*Solanum melogena*	Karaj- Kamalabad	33
J_{29}	*M. javanica*	*Lycopersicum esculentum*	Karaj	34
J_{34}	*M. javanica*	*Coleus blumei*	Karaj- Green house	35
sp_3	*Meloidogyne sp3*	*Beta vulgaris*	Karaj- Gohardasht	36
J_{35}	*M. javanica*	*Lycopersicum esculentum*	Karaj- Mardabad	37
J_{36}	*M. javanica*	*Solanum melogena*	Karaj- Mardabad	38
J_{37}	*M. javanica*	*Lycopersicum esculentum*	Karaj- Mahdasht	39
J_{38}	*M. javanica*	*Lycopersicum esculentum*	Karaj- Jafarabad	40
J_{45}	*M. javanica*	*Amarantus graecizans*	Karaj- Jafarabad	41
J_{50}	*M. javanica*	*Helianthus annus*	Karaj- Songhorabad	42
J_{51}	*M. javanica*	*Solanum melogena*	Karaj- Songhorabad	43
J_{52}	*M. javanica*	*Lycopersicum esculentum*	Karaj- Songhorabad	44
J_{59}	*M. javanica*	*Lycopersicum esculentum*	Karaj	45
J_{60}	*M. javanica*	*Phaseolus vulgaris*	Karaj	46
J_{61}	*M. javanica*	*Cucurbita pepo*	Karaj- Songhorabad	47
J_{62}	*M. javanica*	*Phaseolus vulgaris*	Karaj- Kamalabad	48

Archive of SID

www.SID.ir

Table 1.(continued) جدول ۱- (ادامه)

J_{49}	*M. javanica*	*Pistacia vera*	Kerman	49
J_{16}	*M. javanica*	*Cucumis melo*	Gilan- Talesh	50
J_{18}	*M. javanica*	*Nicotiana tabacum*	Gilan- Someasara	51
I_3	*M. incognita*	*Nicotiana tabacum*	Gilan- Bariran	52
I_4	*M. incognita*	*Nicotiana tabacum*	Gilan- Talesh	53
J_{42}	*M. javanica*	*Nicotiana tabacum*	Gilan- Talesh	54
I_9	*M. incognita*	*Nicotiana tabacum*	Gilan- Fuman	55
I_{13}	*M. incognita*	*Nicotiana tabacum*	Gilan- Bariran	56
I_{17}	*M. incognita*	*Nicotiana tabacum*	Gilan	57
A_3	*M. arenaria*	*Lycopersicum esculentum*	Gilan- Talesh	58
A_4	*M. arenaria*	*Nicotiana tabacum*	Gilan- Talesh	59
I_{18}	*M. incognita*	*Nicotiana tabacum*	Gilan- Someasara-Azgum	60
J_{12}	*M. javanica*	*Actinidia chinensis*	Mazandaran-Nashtarood	61
J_{15}	*M. javanica*	*Actinidia chinensis*	Mazandaran-Royan	62
I_2	*M. incognita*	*Nicotiana tabacum*	Mazandaran-Tirtash	63
I_5	*M. incognita*	*Actinidia chinensis*	Mazandaran-Ghaemshahr	64
J_{40}	*M. javanica*	*Actinidia chinensis*	Mazandaran-Nashtarood	65
J_{41}	*M. javanica*	*Cucurbita pepo*	Mazandaran-Nashtarood	66
I_7	*M. incognita*	*Actinidia chinensis*	Mazandaran-Sokhtehkola	67
I_{11}	*M. incognita*	*Actinidia chinensis*	Mazandaran-Nashtarood	68
I_{12}	*M. incognita*	*Actinidia chinensis*	Mazandaran-Royan	69
A_1	*M. arenaria*	*Actinidia chinensis*	Mazandaran-Royan-Ebrahimabad	70

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱– (ادامه) Table 1.(continued)

A_2	*M. arenaria*	*Actinidia chinensis*	Mazandaran- Bariran	71
A_5	*M. arenaria*	*Actinidia chinensis*	Mazandaran- Nashtarood-Kotra Road	72
I_{20}	*M. incognita*	*Actinidia chinensis*	Mazandaran	73
J_{26}	*M. javanica*	*Beta vulgaris*	Mashhad- Tabadkan	74
J_{39}	*M. javanica*	*Lycopersicum esculentum*	Mashhad- Chaheshk	75
J_{53}	*M. javanica*	*Lycopersicum esculentum*	Mashhad- Hasanabad	76
J_{58}	*M. javanica*	*Satureja hortensis*	Mashhad	77
I_6	*M. incognita*	*Punica granatum*	Varamin- Firozabad	78
I_8	*M. incognita*	*Ficus carica*	Varamin	79
I_{10}	*M. incognita*	*Lycopersicum esculentum*	Varamin	80
J_{54}	*M. javanica*	*Citrollus vulgaris*	Varamin	81
I_{14}	*M. incognita*	*Punica granatum*	Varamin	82
I_{16}	*M. incognita*	*Anethum graveolens*	Varamin	83
I_{19}	*M. incognita*	*Capsicum annuum*	Varamin- Firozabad	84
J_{17}	*M. javanica*	*Beta vulgaris*	Hamedan- Malayer	85
J_{56}	*M. javanica*	*Solanum tuberosum*	Hamedan	86
J_{25}	*M. javanica*	*Cucumis sativus*	Hashtgerd	87
J_{30}	*M. javanica*	*Lycopersicum esculentum*	Hashtgerd	88
J_{48}	*M. javanica*	*Lycopersicum esculentum*	Hashtgerd	89
J_{14}	*M. javanica*	*Solanum melogena*	Yazd- Ardestan	90

اکسید دیسموتاز مورد بررسی قرار گرفت و۹۰ جمعیت از جنس *Meloidogyne* مورد آزمایش قرارداده شد. محل جمع‌آوری نمونه، گیاه میزبان، گونه جداشده و کد مولکولی در جدول شماره (۱) آورده شده است. پس از استخراج نماتدها از ریشه‌های آلوده و شناسایی گونه براساس خصوصیات مرفولوژیکی و مرفومتریکی، جمعیت‌های مختلف هرگونه روی ریشه

Archive of SID

www.SID.ir

بوته‌های سالم گوجه‌فرنگی (رقم Rutgers) در گلخانه تکثیر و از نمونه‌های خالص در کلیه آزمایشها استفاده شد. هر گلدان مربوط به یک جمعیت بود. ابتدا ریشه‌ها جدا شده و پس از شستشوی آن و خرد کردن بافت گیاهی، ماده‌های بالغ، سالم و جوان که توده تخم سفید رنگ دارند در زیر بینوکولر و به کمک پنس از ریشه جدا شدند. برای هر جمعیت ۳۰ عدد نماتود ماده بالغ جوان و سفید رنگ در نظر گرفته شد. نماتودهای جمع‌آوری شده از هر جمعیت بطور جداگانه به هاون چینی منتقل و پس از ساییدن و خرد کردن با ازت مایع، میزان ۶ میکرولیتر بافر نمونه به ازای هر نماتود اضافه شد. بافر نمونه حاوی دو درصد (حجم به حجم)تریتون X-100، ۲۰ درصد (وزن به حجم) ساکارز در آب مقطر می‌باشد. عصاره پروتیینی قبل از تزریق در چاهک‌های ژل به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۸۰۰g در چهار درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. ۳۰ میکرولیتر از مایع‌رویی هر نمونه به وسیله سرنگ در هر چاهک ریخته شد.

الکتروفورز بدون حضور عوامل واسرشت کننده در دمای چهار درجه سانتیگراد انجام گرفت. پس از اتمام الکتروفورز، با بهره‌گیری از واکنش اختصاصی هر آنزیم با سوبسترای ویژه‌اش، نوارهای آیزوزایمی بر روی ژل آشکار شدند. بدین منظور ژل در محلول رنگ آمیزی محتوی سوبسترای ویژه آنزیم، ماده رنگ آمیزی، کمک عامل ویژه آنزیم و بافر با PH مناسب فعالیت آنزیم قرار داده شد (Mc Donald 1997) .

در بررسی فعالیت آنزیم‌ها از ژل جدا کننده ۱۰ درصد و ژل متراکم کننده چهار درصد استفاده شد. در مورد هر ژل عمل الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۱۰۰ دردمای چهاردرجه سانتیگراد به مدت چهار ساعت انجام شد. برای رنگ‌آمیزی ژل در مورد آنزیم استراز و مالات هیدروژناز از روش *کارسن* و همکاران (karssen *et al.* 1995) استفاد شد. در مورد آنزیم استراز، ژل در ۵۰ میلی لیترمحلول بافرفسفات پتاسیم ۱/ ۰ مولار(PH ۷/۳) حاوی ۳۰ میلی گرم نمک فست بلو آرآر، ۱۵ میلی گرم EDTA و ۲۰ میلی‌گرم آلفا نفتیل استات قرار داده شد ودر دمای ۳۷ درجه سانتیگراد منتقل گردید. پس از ۴۵ دقیقه نوار ها ظاهر شدند سپس ژل را شسته و پس از عکسبرداری در حرارت چهار درجه سانتیگراد نگهداری شد. برای رنگ آمیزی ژل درمورد آنزیم مالات دی هیدروژناز، ژل به مدت ۱۰ دقیقه در محلول حاوی ۵۰ میلی گرم B- NAD، ۳۰ میلی گرم نیتروبلوتترازولیوم (NBT)، ۲۰ میلی گرم فنازین متاسولفات، ۵ میلی لیتر بافر

Archive of SID

www.SID.ir

تریس۰/۵ مولار(PH ۷/۱)،۷/۵ میلی لیتر Stock که حاوی ۱۰/۶ گرم کربنات سدیم و ۱/۳۴ گرم اسید مالیک فرم L در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر است در ۷۰ میلی لیتر آب مقطر استریل قرار داده شد و در۳۷ درجه سانتیگراد منتقل گردید تانوارها ظاهر شد. B- NAD و NBT در تاریکی به محلول رنگ آمیزی اضافه شد.

در مورد آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برای رنگ آمیزی ژل از روش *تنکسلی و اورتن* (Tanksley & Orton 1983) استفاده شد. برای این منظور ابتدا ژل به مدت ۲۰ دقیقه در محلول حاوی ۵۰ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم (۵۰ میلی مولار با PH ۷/۸)، ۱۰ میلی گرم نیتروبلوتترازولیوم (۰/۱۲میلی مولار) روی شیکر درتاریکی قرار گرفت. سپس ژل به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در محلول دوم حاوی ۵۰ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم (۳۰ میلی مولار با ۷/۸ PH)، ۰/۵میلی گرم ریبوفلاوین (۰/۲۶ میلی مولار) و ۲۲۵ میکرولیتر TEMED (۱۵ میلی مولار) تحت تابش مستقیم نور فلور سنت قرار گرفت تا نوارهای روشن در زمینه آبی ژل آشکار گردید.

نتیجه

در بررسی ۹۰ جمعیت از جنس *Meloidogyne* ، ۶۲ جمعیت مربوط به گونه *M. javanica* ، ۲۰ جمعیت مربوط به گونه*M. incognita*، پنج جمعیت مربوط به گونه *M. arenaria* و سه جمعیت ناشناخته بود. جمعیت‌های مربوط به گونه *M. javanica* فنوتیپ استرازی J_3 را نمایش دادند. در این فنوتیپ سه نوار ایجاد شده که دارای سرعت حرکت الکتروفورتیکی ۴۶، ۵۵ و ۵۹ درصد می‌باشد (شکل۱). جمعیت‌های مربوط به گونه *M. incognita* فنوتیپ استرازی I_1 را نمایش دادند. در این فنوتیپ یک نوار ایجاد شده دارای سرعت حرکت الکتروفورتیکی ۴۷ درصد می‌باشد (شکل ۱). دریک جمعیت از این گونه یک نوار فنوتیپی خیلی آهسته مشاهده شد که در بررسی‌های انجام شده این نوار درنظر گرفته نشد (شکل۱ ،I_6). در جمعیت‌های گونه *M. arenaria* نوار یا نوارهای ثابتی که مشخصه گونه باشد، مشاهده نشد. درمیان گونه‌های توصیف نشده *Meloidogyne* sp_1 ، *Meloidogyne* sp_2 و *Meloidogyne* sp_3 که از نظر شکل شبکه کوتیکولی انتهای بدن شبیه گونه *M. incognita* بودند

Archive of SID

www.SID.ir

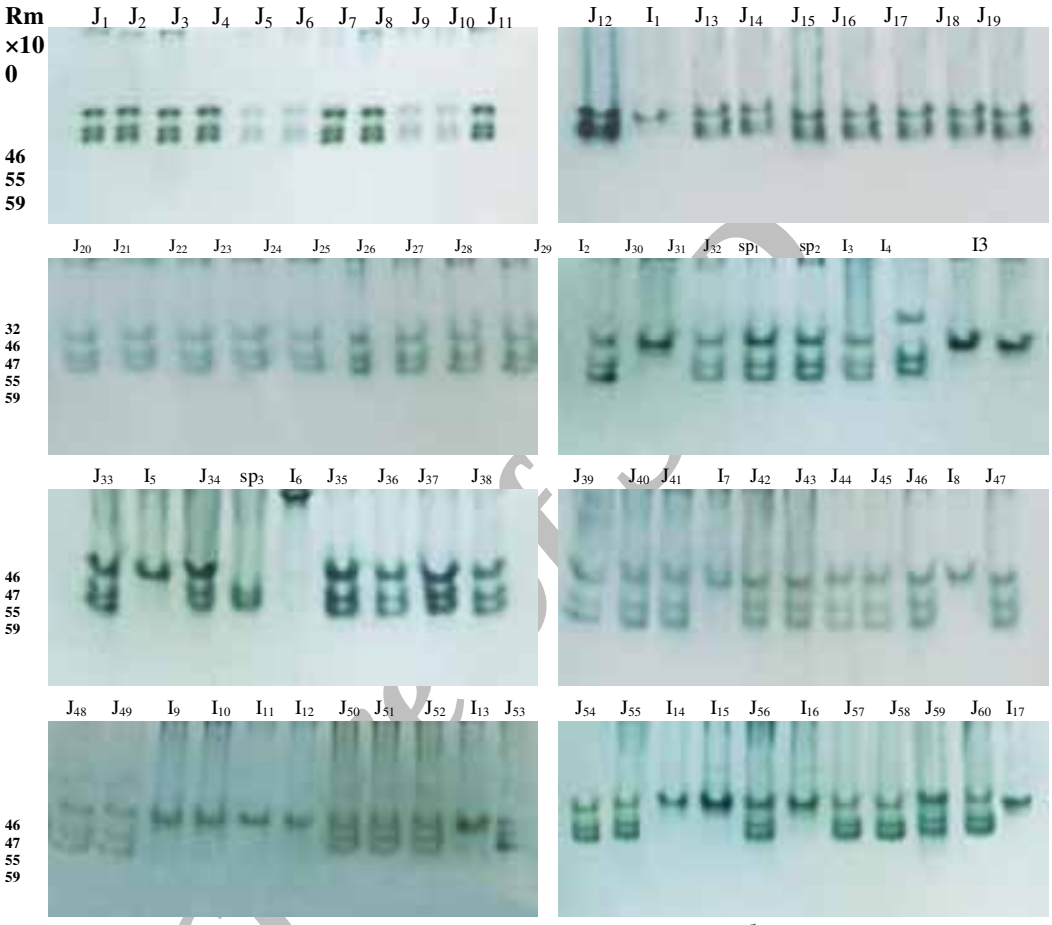
اما اختلافات مرفولوژیکی و مرفومتریکی عمده‌ای بین سه گونه مذکور و گونه *M. incognita* در رابطه با ماده‌های بالغ و لاروهای سن دوم از نظر فاصله فاسمیدها، شکاف فرج، فاصله فاسمید و مخرج، طول استایلت، فاصله منفذ دفعی ترشحی از ابتدای بدن، طول هیالین و شکل دم در لارو سن دوم وجود دارد. شکل شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌های بالغ این گونه‌ها نیز متفاوت است بطوریکه در گونه *Meloidogyne* sp_1 شبکه کوتیکولی انتهای بدن چند وجهی بلند و دارای کمان پشتی بلند، خطوط سطوح جانبی بدن نامشخص، شیارهای بدن ضخیم و طناب مانند و فاسمیدها بسیار نزدیک به هم می‌باشد. در گونه *Meloidogyne* sp_2 شکل شبکه کوتیکولی انتهای بدن شش وجهی با شیارهای عمیق و موجدار،وجود شیارهای طولی کوتاه بین شیارهای عرضی که آنها را قطع می‌کند. در گونه *Meloidogyne* sp_3 شکل شبکه کوتیکولی انتهای بدن کروی تا بیضی شکل، شیارهای شبکه کوتیکولی انتهای بدن صاف تا موجدار ناپیوسته و نزدیک به یکدیگر و شیارهای کوتاهی به فرج متصل است. علاوه بر اختلافات مرفولوژیکی و مرفومتریکی ذکر شده، فنوتیپ استرازی درگونه اول J_3 و درگونه دوم سه نوار باسرعت حرکت الکتروفورتیکی ۳۲، ۵۵، ۵۹ درصد و درگونه سوم دو نوار باسرعت حرکت الکتروفورتیکی ۵۵ و ۵۹ درصد ایجاد شد. (شکل۱، sp_1، sp_2 و sp_3).

در نتایج بدست آمده از این تحقیق همچون مطالعات *اسبنشاد و تریانتوفیلو* (Esbenshade & Triantaphyllou 1985 1990) ۱۰۰ درصد جمعیت‌های *M. javanica* فنوتیپ استرازی J_3 و ۹۸ درصد از جمعیت‌های *M. incognita* فنوتیپ استرازی I_1 را نمایش دادند. در مطالعات *پیز و ابرنتس* (Pais & Abrantes 1989) نیز ۱۰۰ درصد جمعیت‌های *M. javanica* فنوتیپ استرازی J_3 و از یازده جمعیت *M. incognita*، هفت جمعیت فنوتیپ استرازی I_1 و چهار جمعیت دیگر فنوتیپ‌های دیگر را نمایش دادند.

بود و نوار ثابتی که مشخصه گونه خاصی بوده و قابل تکرار باشد ایجاد نشد. نوارهای ایجاد شده از فعالیت آنزیمی مالات دی هیدروژناز در رابطه با جمعیت‌های گونه *M. incognita* نسبت به جمعیت‌های گونه *M. javanica* محدودتر بود (شکل۲ A-F). در مطالعات *اسبنشاد و تریانتوفیلو* (Esbenshade & Triantaphyllou 1985, 1990) نیز چند شکلی آنزیمی مالات دی هیدروژناز جمعیت‌های دو گونه *M. javanica* و *M. incognita* را از هم متمایز نکرد.

Archive of SID

www.SID.ir

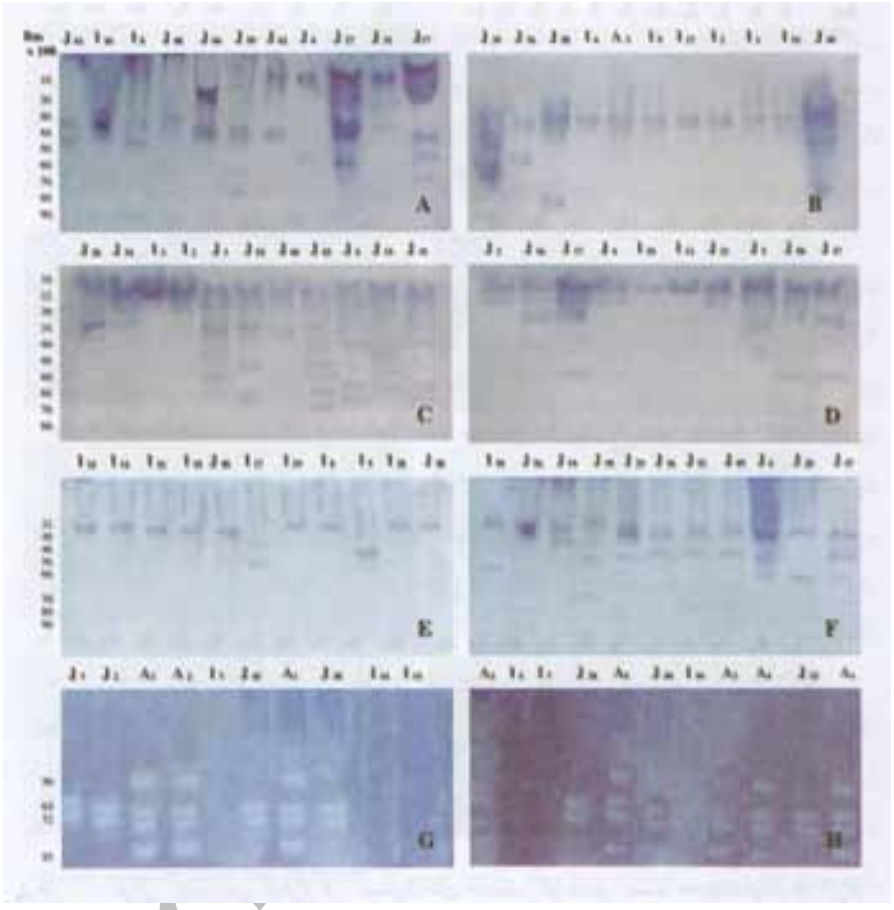


شکل ۱- نقوش آیزوزایمی استراز در جمعیت‌های مختلف گونه‌های عمده *Meloidogyne* در ایران (J)*M. javanica* دارای سه نوار با Rm ۴۶ ، ۵۵ و ۵۹ درصد ؛(I) *M.incognita* دارای یک نوار با Rm ۴۷ درصد؛ *Meloidogyne* sp_1(sp_1) دارای سه نوار با Rm ۴۶، ۵۵ و۵۹ در صد ؛ *Meloidogyne* sp_2 (sp_2) دارای سه نوار با RM ۳۲ ، ۵۵ و۵۹ در صد ؛ *Meloidogyne* sp_3 (sp_3) دارای دو نوار با Rm ۵۵ و۵۹ در صد .

Fig. 1: Esterase profiles of different populations of *Meloidogyne* species in Iran. (J) *M. javanica* with three bands (46,55 ,59 Rm) ; (I) *M. incognita* with one band (47 Rm); (sp_1) *Meloidogyne* sp_1 with three bands (46,55, 59 Rm); (sp_2) *Meloidogyne* sp_2 with three bands (32,55,59 Rm); (sp_3) *Meloidogyne* sp_3 with two bands (55,59 Rm).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- نقوش آیزوزایمی مالات دی هیدروژناز(A-F) و سوپراکسید دیسموتاز(G وH) جمعیت‌های مختلف گونه‌های عمده*Meloidogyne* در ایران. (A) *M. arenaria* ، (J) *M. javanica* و(I) *M. incognita*، در رابطه با آنزیم سوپراکسیددیسموتاز *M. arenaria* دارای چهار نوار با Rm ۵۰ ، ۶۵ ، ۷۲ و ۸۵ در صد و *M. javanica* دارای دو نوار با Rm ۶۵ و۷۲درصد.

Fig. 2: Malate dehydrogenases (A-F) and Superoxide dismutases (G,H) profiles of different populations of *Meloidogyne* species in Iran. (A) *M. arenaria,* (J) *M. javanica* and (I) *M. incognita* superoxide dismutase banding pattern was determined in *M. arenaria* with four bands (50,65,72,85 Rm) ; *M. javanica* with two bands (65,72 Rm).

www.SID.ir

نوارهای ایجاد شده مالات دی هیدروژناز درمورد جمعیت‌های مختلف یک گونه متغیر فنوتیپ‌های آنزیمی مالات دی هیدروژناز جهت تفکیک دو گونه*M. incognita* و *M. hapla* از یکدیگر و هم چنین دو گونه*M. naasi* Franklin 1965 و*M. exigua* Goeldi 1887 که فنو تیپ استرازی یکسانی دارند بکار رفته است. در مطالعات *پیز و ابرنتس* (Pais & Abrantes 1989) در رابطه با فعالیت آنزیم مالات دی هید روژناز سه فنوتیپ N_3 ، P_3 و H_2 مشاهده شد و متداولترین فنوتیپ N_3 بود که در جمعیت‌های *M. javanica* ، *M. incognita* و *M. arenaria* مشاهده شد. در این مطا لعه نیز فنوتیپ مشخصی از آنزیم مالات دی هیدروژناز که خاص گونه *M. javanica* و *M. incognita* باشد، ایجاد نشد.

در خصوص فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز فنوتیپ A_4 با چهار نوار بزرگ و مشخص با سرعت حرکت الکتروفورتیکی ۵۰ ، ۶۵ ، ۷۲ و ۸۵ درصد در جمعیت‌های *M. arenaria* مشاهده شد (شکل۲، G و H). جمعیت‌های *M. javanica* فنوتیپ معرفی شده N_2 را نشان دادند (دو نوار مشخص باسرعت حرکت الکتروفورتیکی۶۵ و۷۲ درصد) و در جمعیت‌های گونه *M. incognita* فنوتیپ خاصی از فعالیت این آنزیم مشخص نشد. درمطالعات *اسبنشاد و تریانتوفیلو* (Esbenshade & Triantaphyllou 1985 1990) نیز مشخص شد که با فنوتیپ‌های سوپر اکسید دیسموتاز میتوان گونه *M. arenaria* را از سایر گونه‌های این جنس متمایز کرد و فنوتیپ ایجاد شده از این آنزیم مخصوص گونه *M. arenaria* می باشد. از سوی دیگر در مطالعات *اسبنشاد و تریانتوفیلو* (Esbenshade & Triantaphyllou 1985 1990) جمعیت‌های *M. javanica* فنوتیپJA_2 را از آنزیم سوپراکسید دیسموتاز آشکار ساختند. فنوتیپ های N_2 و JA_2 هر دو دارای دو نوار می باشند اما سرعت حرکت ا لکتروفورتیکی این نوارها با هم متفاوت است. در مورد فنوتیپ A_4 نیز تحرک نسبی الکتروفورتیکی چهار نوار ایجاد شده در نمونه‌های ایران با مطالعات *اسبنشاد و تریانتوفیلو* (Esbenshade & Triantaphyllou 1985 1990)تفاوت دارد. بطوریکه سرعت حرکت ا لکتروفورتیکی چهار نوار ایجاد شده از فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در نمونه‌های ایران ۵۰، ۶۵، ۷۲ و ۸۵ درصد بوده در حالیکه در مطالعات *اسبنشاد و تریانتوفیلو* (Esbenshade & Triantaphyllou 1985, 1990) چهار نوار ایجاد شده فنوتیپ A_4 دارای سرعت

Archive of SID

www.SID.ir

حرکت الکتروفورتیکی ۵۰، ۵۴، ۵۸ و ۶۲ درصد می‌باشد. تفاوت سرعت حرکت الکتروفورتیکی نوارهای ایجاد شده در نمونه‌های ایران و مطالعات *اسبنشاد و تریانتوفیلو* (Esbenshade & Triantaphyllou 1985 1990) ممکن است مربوط به درصد ژل جدا کننده باشد. چون درمورد هر دو گونه *M. javanica* و *M. arenaria* در رابطه با آنزیم سوپراکسید دیسموتاز اختلاف در سرعت حرکت الکتروفورتیکی وجود دارد.

این بررسی نشان داد که الگوی استراز صفت اختصاصی قابل اعتمادی جهت شناسایی گونه *M. javanica* است بطوریکه میتوان آنرا بعنوان مارکردر ژلهای دیگر در رابطه با گونه‌های دیگر مورد استفاده قرار داد. نود و هشت درصد از جمعیت‌های *M. incognita* فنوتیپ استرازی ویژه خودیعنی I_1 را داشته اند. چند شکلی آنزیمی مالات دی هیدروژناز می تواند جمعیت‌های دو گونه *M. incognita* و *M. hapla* را از هم متمایز کند. در این مطالعه به جهت اینکه جمعیت گونه *M. hapla* کم بوده ودر بررسی خصوصیات بیوشیمیایی مورد نظر نبوده است چند شکلی آنزیمی مالات دی هیدروژناز کاربردی نداشته است. پس از آنزیم استراز، فنوتیپ های سوپر اکسید دیسموتاز بالاترین توا نایی را در تفکیک گونه‌های *Meloidogyne* نشان دادند. فنوتیپ A_4 از آنزیم سوپراکسید دیسموتاز منحصرا" در جمعیت‌های *M. arenaria* دیده شد و ثابت شد که برای این گونه ویژه است.

برای بررسی این مطلب که آیا گیاه میزبان که نماتد روی آن تکثیر یافته ویا فعالیت داشته است روی چند شکلی آنزیمی اثر دارد یا خیر؟ جمعیت‌های مختلف گونه *M. javanica* که در ایران بیشترین فراوانی را داشته و از روی میزبانهای مختلف (هویج، فلفل، کلم، گوجه‌فرنگی، بادنجان، ریحان،خرفه، سلمه، کدو، خیار و تاج خروس) و از یک منطقه جغرافیایی (ارومیه – بادرلو) جمع‌آوری شده بودند از نظر فعالیت آنزیمی استراز موردمقایسه قرارگرفت (شکل ۱، A). هیچگونه اختلافی ازنظر فعالیت آنزیم استراز بین جمعیت‌های مختلف گونه *M. javanica* بر روی میزبانهای مختلف یک منطقه مشاهده نشد. در مطالعات *پیز و ابرنتس* (Pais & Abrantes 1989) نیز میزبان روی فعالیت آنزیمهای استراز ومالات دی هیدروژناز هیچگونه تاثیری نداشته است.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (8-6) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: عصمت مهدیخانی‌مقدم، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، دکتر احمد خیری و دکتر مجتبی محمدی، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

Archive of SID

www.SID.ir

Referencess

ABRANTES, I. M. O. and SANTOS, S. N. A., 1989. A technique for preparing perineal pattern of root-knot nematodes for scanning electron microscopy. **J. Nematol. 21:**

* Corresponding author

www.SID.ir

138-139.

BERGE, J.B.and DALMASSO, A., 1975.Characteristiques biochimiques de quelques population de *Meloidogyne hapla* et *Meloidogyne* spp. Cahiers de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre Mer Serie **Biologe 10:** 263-271.

DALMASSO, A. and BERGE, J.B., 1978. Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp. Application to the taxonomy of *Meloidogyne*. **J. Nematol. 10:** 323-332.

DICKSON, D.W.; HUISINGH, D. and SASSER, J.N., 1971. Dehydrogenases, acid and alkalin phosphatases and esterases for chemotaxonomy of selected *Meloidogyne* , *Ditylenchus* , *Heterodera* and *Aphelenchus* spp. **J. Nematol. 1 :** 1-16.

ESBENSHADE, P.R. and TRIANTAPHYLLOU, A.C., 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. **J. Nematol. 17(1):** 6-20.

ESBENSHADE, P. R. and TRIANTAPHYLLOU, A. C., 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. **J. Nematol. 22(1):** 10-15.

HUSSEY, R. S. ; SASSER, J. N. and HUISINGH, D., 1972. Disc electrophoretic studies of soluble proteins and enzymes of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. **J. Nematol. 4:** 183- 189.

KARSSEN, G. ; HOENSELAAR, T, ; BAKKER. B. V. and JANSSEN, R., 1995. Species indentification of cyst and root-knot nematodes from potato by electrophoresis of individual females. **Electrophoresis. 16:** 105-109.

KARSSEN, G. ; VAN AELST, A. and VANDER PUTTEN, W. H., 1998. *Meloidogyne duytsi* n. sp. (Nematoda : Heteroderidae), a root-knot nematode from Dutch coastal fore dunes. Fundam. appl. **Nematol. 21(3):** 299-306.

LAWSON, E. C. ; CARTER, G. E. and LEWIS, S. A., 1984. Application of Isoelectric

Archive of SID

www.SID.ir

Focusing to the taxonomic identification of *Meloidogyne* spp. **J. Nematol. 16(1) :** 91-96.

PAIS, S.C. and ABRANTES, I.M.O., 1989. Esterase and malate dehydrogenase phenotypes in Pourtuguese population of *Meloidogyne* species. **J. Nematol. 21(3):** 342-346.

TANKSLEY, S. D. and ORTON, T. J., 1983. Enzyme activity staining. In : Vallejoes, C. E. (ed.) Isozymes in plant Genetic and Breeding. Part A. 469-516.

Address of authors: E. MEHDIKHANI MOGHADAM, Dept. of Plant Protection, College of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran, KHEIRI and M.MOHAMADI, Dept. of Plant Protection, College of Agriculture, Tehran University, Karaj, Iran

Archive of SID

www.SID.ir