

مقایسه جمعیت‌های مختلف *Heterodera schachtii* با استفاده از مشخصات مورفولوژیکی و مولکولی*

COMPARISON OF MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERS OF DIFFERENT POPULATIONS OF *Heterodera schachtii*

عباس مکرّم حصارا، عصمت مهدیخانی مقدم^۱ و زهرا تنها معافی^{۲*}

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۹/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۴/۲۹)

چکیده

گونه *Heterodera schachtii* یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای چغندر قند در دنیا است. این نماتود در اکثر مناطق تحت کشت این گیاه در ایران گسترش دارد و موجب کاهش عملکرد و میزان قند موجود چغندر تولید شده در مزارع آلوده می‌شود. جمعیت‌های مختلف *H. schachtii* از لحاظ خصوصیات مورفولوژیکی بسیار متفاوت هستند و شناسایی آنها براساس خصوصیات مورفولوژیکی و مورفومتریکی سیستم‌ها و لاروهای سن دوم بسیار وقت‌گیر بوده و نیازمند مهارت و دقت زیاد می‌باشد. در سال‌های اخیر امکان استفاده از روش ITS-PCR-RFLP برای تفکیک این گونه از سایر گونه‌های موجود بررسی شده است. در این بررسی ۱۲۰ جمعیت از نماتود سیستمی چغندر قند از مزارع مختلف در استان خراسان رضوی جمع‌آوری شد و سیستم‌ها از لحاظ خصوصیات مورفولوژیکی و مورفومتریکی مورد بررسی قرار گرفتند. در میان این جمعیت‌ها، ۸۸ جمعیت که تفاوت‌های مورفولوژیکی نسبتاً زیادی با هم داشتند، انتخاب شدند. پس از استخراج DNA، تکثیر ناحیه rDNA-ITS با استفاده از آغازگرهای عمومی این ناحیه انجام شد. محصول PCR هر نمونه با استفاده از آنزیم برشی *MvaI* هضم شد. تمامی ۸۸ نمونه الگوی بانندی مشابهی را تولید کردند که با الگوی ارائه شده برای این گونه در منابع معتبر همخوانی دارد. پس از تایید گونه، گروه‌بندی جمعیت‌های ذکر شده براساس خصوصیات مورفومتریکی نشان داد که جمعیت‌های مناطق شمالی استان از جمعیت‌های مناطق جنوبی قابل تفکیک است، هر چند براساس مناطق کوچک‌تر جغرافیایی تفکیک قابل قبولی صورت نگرفت. هم‌چنین براساس طول باندهای کوتیکولی ناحیه واژن و برجستگی‌های گره مانند موجود در مخروط انتهایی بدن سیستم‌ها، چهار تیپ مورفولوژیکی تشخیص داده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که روش ITS-PCR-RFLP می‌تواند در شناسایی جمعیت‌های مختلف *H. schachtii* با دامنه وسیع تفاوت‌های مورفولوژیکی بسیار کارآمدتر و سریع‌تر از روش‌های مورفولوژیکی باشد.

واژه‌های کلیدی: گروه‌بندی، نماتود سیستمی چغندر قند، خراسان رضوی، مورفولوژی، ITS-PCR-RFLP، *Heterodera schachtii*

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

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

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲. دانشیار بخش تحقیقات نماتودشناسی، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور

مقدمه

چغندر قند استان خراسان رضوی جداسازی و شناسایی شده‌اند. لازم به ذکر است که شناسایی این گونه‌ها تنها براساس خصوصیات مرفولوژیکی و مرفومتريکی انجام شده است. گونه *H. schachtii* در گروه *schachtii* و در کنار گونه‌هایی مثل *H. schachtii*، *H. daverti*، *H. ciceri*، *H. betae*، *H. galeopsidis*، *H. lespedezae*، *H. glycines*، *H. rosii*، *H. medicaginis*، *H. trifolii* قرار دارد (Subbotin et al. 2001; Tanha Maafi et al. 2003). تفاوت‌های مرفولوژیکی بین این گونه‌ها، به خصوص دو گونه *H. trifolii* و *H. schachtii* بسیار جزئی می‌باشند. گونه دوم در مزارع چغندر قند خراسان دارای پراکنش زیادی می‌باشد و علاوه بر خاک از ریشه‌های چغندر قند نیز جداسازی شده است. به همین دلیل احتمال بروز خطا در شناسایی وجود دارد (Mahdikhani Moghadam et al. 1996; Mahdikhani Moghadam & Jafarpour 2008). از سوی دیگر شناسایی این نامتودها بیشتر بر اساس مشخصات مرفولوژیکی و مرفومتريکی مخروط انتهای سیست نامتود صورت می‌گیرد. تهیه برش از این قسمت بدن در مواردی که نیاز به بررسی جمعیت‌های زیادی می‌باشد، کاری وقت‌گیر بوده و در بعضی موارد ممکن است سیست‌های مناسبی برای تهیه برش در دسترس نباشد (Karegar 2006)، مخصوصاً زمانی که آزمون خاک به منظور تعیین آلودگی به این نامتود قبل از کاشت زمین انجام می‌شود که در این مواقع معمولاً سیست‌ها شکل مناسبی ندارند و امکان شناسایی با استفاده از لاروهای سن دوم نیز با توجه به مشابهت زیاد بین گونه‌ها امکان‌پذیر نیست. از این رو شناسایی مرفولوژیکی این نامتودها در مجموع کاری دشوار و وقت‌گیر است (Shiqi et al. 2003; Amiri et al. 2008). شناسایی مولکولی

نامتود سیستی چغندر قند با نام علمی *Heterodera schachtii* Schmidt 1871، یکی از نامتودهای مهم انگل گیاهی و خسارت‌زا در نقاط مختلف دنیا می‌باشد (Baldwin & Mundo-Ocampo 1991; Evans & Rowe 1998; Plantard & Porte 2003). این نامتود به ۲۰۰ گونه از ۹۵ جنس و ۲۳ خانواده مختلف گیاهی حمله می‌کند. اکثر میزبان‌های آن در خانواده‌های *Cruciferae* و *Chenopodiaceae* یافت می‌شوند (Steele 1965). این نامتود سبب کاهش عملکرد و میزان تولید قند در چغندرکاری‌های آلوده به آن می‌شود، به‌طوریکه در کشورهای اروپایی میزان خسارت ناشی از این نامتود در حدود ۹۰ میلیون یورو در سال برآورد شده است (Müller 1999).

گونه *H. schachtii* در ایران برای اولین بار از چغندرکاری‌های تربت حیدریه در استان خراسان گزارش شد (Esmailpour & Schaffer 1970). در بررسی نامتودهای سیستی ایران، هفت گونه نامتود سیستی، *H. rosii*، *H. mothi*، *H. iri*، *H. schachtii*، *H. avenae* و *H. latipons*، *H. trifolii*، *H. galeopsidis*، *H. avenae* و *H. latipons* group از چغندرکاری‌های کشور شناسایی شده و استان‌های خراسان، آذربایجان غربی و فارس به عنوان آلوده‌ترین مناطق به نامتود سیستی چغندر قند تشخیص داده شده‌اند (Talachian et al. 1976). در طی سال‌های بعد، پراکنش این گونه در نقاط مختلف ایران مورد بررسی قرار گرفت (Mahdikhani Moghadam & Kheiri 1995; Akhiani et al. 1996; Khezrinejad et al. 2006; Karegar 2006; Mahdikhani Moghadam & Jafarpour 2008). هم‌چنین گونه‌های *H. carotae* و *H. cruciferae* (Mahdikhani Moghadam & Jafarpour, 2008) و نیز گونه *H. mani* (Mahdikhani

نماتود و تعیین اشکال مختلف مرفولوژیکی آن در ایران صورت نگرفته است، بررسی حاضر روی جمعیت‌های مختلف نماتود سیستی چغندر قند در استان خراسان رضوی انجام گردید. در این تحقیق جمعیت‌های مختلف با استفاده از خصوصیات مرفولوژیکی و مرفومتريکی مخروط انتهایی سیست‌ها و لاروهای سن دوم شناسایی شده و برای آزمون کارایی روش‌های مرفولوژیکی از روش ITS-PCR-RFLP استفاده گردید. در نهایت با توجه به اختلافات مرفولوژیکی زیادی که بین جمعیت‌های مختلف این گونه قابل مشاهده بود، تلاش شد تا با استفاده از گروه‌بندی مرفومتريکی جمعیت‌های مختلف، گروه‌بندی مرفولوژیکی مناسبی برای جمعیت‌های مختلف این گونه تعیین شود.

مواد و روش‌ها

در طول سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۸۹ تعداد ۱۲۰ نمونه خاک و ریشه چغندر قند از مزارع آلوده به نماتود سیستی چغندر قند در استان خراسان رضوی جمع‌آوری گردید که از میان آنها ۸۸ جمعیت که مشخصات آنها در جدول ۱ آورده شده است، انتخاب شدند. جهت استخراج نماتودهای سیستی از خاک، ترکیبی از روش‌های (Dunn, 1969) و (Seinhorst, 1964) استفاده شد. برش‌های لازم از مخروط انتهایی سیست‌ها تهیه گردید. هم‌چنین برای تثبیت لاروهای سن دوم داخل سیست‌ها از روش (De Grisse 1969) استفاده شد. مشخصات مرفومتري استاندارد (جدول‌های ۲ و ۳) با استفاده از میکروسکوپ نوری الیمپوس BH2، مجهز به لوله ترسیم تهیه گردید. گروه‌بندی جمعیت‌های مختلف بر اساس داده‌های مرفومتريکی و مرفولوژیکی، با استفاده از نرم‌افزار STATISTICA ver5.5a و با روش UPGMA

نماتودهای انگل گیاهی، به خصوص نماتودهای سیستی بر پایه روش‌های مبتنی بر PCR می‌تواند بسیار سریع‌تر و راحت‌تر از روش‌های دشوار و وقت‌گیر مرفولوژیکی باشد (Powers et al. 1997; Subbotin et al. 2001; Tanha Maafi et al. 2003). استفاده از چندشکلی طولی قطعات برشی (RFLPs) نواحی ITS ژن rDNA می‌تواند بسیار مفید باشد. در این روش ابتدا ناحیه ITS1-ITS2 5.8S توسط آغازگرهای عمومی این ناحیه تکثیر می‌شود و سپس قطعه تکثیر شده توسط آنزیم‌های برشی مختلف مورد هضم قرار می‌گیرد. این روش در کنار روش توالی‌یابی ناحیه ITS، برای شناسایی نماتودهای سیستی ایران مورد استفاده قرار گرفته و تعداد محدودی از جمعیت‌های گونه *H. schachtii* نیز شناسایی شده است (Tanha Maafi et al. 2003).

هم‌چنین از این روش برای شناسایی جمعیت‌های مختلف گروه *avenae* در مزارع چغندر قند استان خراسان رضوی استفاده شده است (Mokaram Hesar et al. 2010). در مورد گونه *H. schachtii* نشان داده شده است که هضم قطعه تکثیری مورد نظر با استفاده از آنزیم برشی *MvaI* می‌تواند الگوی برشی منحصر به فردی را برای جمعیت‌های مختلف این گونه ایجاد کند و آن را از گونه‌های نزدیک به آن در گروه متمایز نماید (Amiri et al. 2001, 2002; Tanha Maafi et al. 2003). نخستین گام برای اعمال روش‌های مختلف مدیریتی شناسایی صحیح گونه نماتود می‌باشد. با توجه به اختلافات مرفولوژیکی و مرفومتريکی زیاد بین جمعیت‌های مختلف گونه *H. schachtii* و اهمیت بالای این نماتود در کشور، به خصوص استان خراسان رضوی به عنوان بزرگ‌ترین تولیدکننده چغندر قند در ایران، هم‌چنین با در نظر گرفتن این‌که تاکنون کار وسیعی در جهت شناسایی مولکولی این

جدول ۱. مشخصات جمعیت‌های نماتود سیستی چغندر قند جمع‌آوری شده از مزارع چغندر قند استان خراسان رضوی

Table 1. Populations of sugar beet cyst nematode, collected from sugar beet fields of Khorasan Razavi province

No.	محل جمع‌آوری	کد شناسایی	ردیف	محل جمع‌آوری	کد شناسایی
1	Sarakhs - 1	Sar1	45	Ghochan	Ghoch7
2	Sarakhs - 2	Sar2	46	Ghochan	Ghoch8
3	Sarakhs - 3	Sar3	47	Fariman - Aghkamar - 1	Far1
4	Sarakhs - 4	Sar4	48	Fariman - Aghkamar - 2	Far2
5	Mashhad - Abkoh - 1	Mash1	49	Fariman - Kalate Sefid	Far3
6	Mashhad - Abkoh - 2	Mash2	50	Fariman - Sefid sangh	Far4
7	Mashhad - Abkoh - 3	Mash3	51	Fariman - Sisetare	Far5
8	Mashhad - Torogh - 1	Mash4	52	Fariman - Ghalandarabad	Far6
9	Mashhad - Torogh - 2	Mash5	53	Fariman - Asadieh	Far7
10	Mashhad - Malabad	Mash6	54	Fariman - Kate shamshir	Far8
11	Shirvan - 1	Shir1	55	Fariman - Jolghe zave	Far9
12	Shirvan - 2	Shir2	56	Fariman - Ghalandarabad	Far10
13	Shirvan - 3	Shir3	57	Fariman - Taghiabad - 1	Far11
14	Chenaran - Eskandarabad - 1	Chen1	58	Fariman - Taghiabad - 2	Far12
15	Chenaran - Eskandarabad - 2	Chen2	59	Fariman - Nasrabad	Far13
16	Chenaran - Navakh	Chen3	60	Fariman - Jolghe zave - 1	Far14
17	Chenaran - Radkan - Saroje	Chen4	61	Fariman - Jolghe zave - 2	Far15
18	Chenaran - Sefidjan - 1	Chen5	62	Fariman - Jolghe zave - 3	Far16
19	Chenaran - Sefidjan - 2	Chen6	63	Fariman - Sefid sangh - 1	Far17
20	Chenaran - Darzab	Chen7	64	Fariman - Sefid sangh - 2	Far18
21	Chenaran - Kamalabad - 1	Chen8	65	Torbate Jam - Moradabad	TJ1
22	Chenaran - Kamalabad - 2	Chen9	66	Torbate Jam	TJ2
23	Chenaran - Kamalabad - 3	Chen10	67	Torbate Jam	TJ3
24	Chenaran - Rezaabad - 1	Chen11	68	Torbate Jam	TJ4
25	Chenaran - Rezaabad - 2	Chen12	69	Torbate Heydarie	TH1
26	Chenaran - Joghan	Chen13	70	Torbate Heydarie	TH2
27	Chenaran - Saroje - 1	Chen14	71	Torbate Heydarie	TH3
28	Chenaran - Saroje - 2	Chen15	72	Torbate Heydarie	TH4
29	Chenaran - Kalate Mir Hosein	Chen16	73	Torbate Heydarie	TH5
30	Chenaran - Masi hazrati	Chen17	74	Torbate Heydarie	TH6
31	Chenaran - Mahmoabad - 1	Chen18	75	Kashmar	Kash1
32	Chenaran - Mahmoabad - 2	Chen19	76	Kashmar	Kash2
33	Chenaran - Beyramshah	Chen20	77	Kashmar	Kash3
34	Chenaran - Sarhangh - 1	Chen21	78	Kashmar	Kash4
35	Chenaran - Sarhangh - 2	Chen22	79	Sabzevar	Sab1
36	Chenaran - Shirafkan	Chen23	80	Sabzevar	Sab2
37	Chenaran - Ashraf	Chen24	81	Sabzevar	Sab3
38	Chenaran - Ghizi	Chen25	82	Sabzevar	Sab4
39	Ghochan	Ghoch1	83	Sabzevar	Sab5
40	Ghochan	Ghoch2	84	Neyshabour	Ney1
41	Ghochan - Hasanabad	Ghoch3	85	Neyshabour - Ahangharan	Ney2
42	Ghochan	Ghoch4	86	Neyshabour - Abasabad	Ney3
43	Ghochan	Ghoch5	87	Neyshabour - Hamidabad	Ney4
44	Ghochan	Ghoch6	88	Neyshabour	Ney5

جدول ۲. مشخصات مورفومتریکی مخروط انتهایی سیستم جمعیت‌های مختلف *Heterodera schachtii* (اندازه‌ها به میکرومتر)

Table 2. Morphometric characters of vulval areas of different populations of the *Heterodera schachtii* (Measurements in μm)

No.	Vulval cone (n)	Fenestral Length	Fenestral Width	Vulval Slit Length	Underbridge length	Underbridge width
1	9	(20-25), 23.2±1.2	(15-20), 18.5±0.9	(36-42), 38.4±1.6	(90-102), 96±2.8	(22-26), 24±1.5
2	12	(21-24), 23±1.3	(16.5-22), 19±1.1	(33-36.5), 35.5±0.5	(92-105), 98±2.3	(22-31), 26±3.2
3	11	(26-32), 28.4±1.1	(24-26), 25.1±0.5	(37-45), 39±0.9	(92-105), 95±1.9	(22-29), 24±1.4
4	8	(24.5-33), 29.8±1	(23.5-31), 25.2±1.6	(36-47), 41±1.1	(83-105), 96±3	(23.5-31), 27±2.6
5	7	(21-26), 24.5±1.4	(17-19.5), 18±0.6	(30-38.5), 36±0.7	(88-102), 97±2	(22.5-34), 24±2
6	8	(23-29), 25±1.6	(17-23), 20±1.3	(32-39), 33.5±0.9	(95-112), 98±2.1	(21-27), 25±1.7
7	10	(22-26.5), 24±1	(19-21.5), 20.5±0.7	(31.5-38), 36±1	(93-112), 97±2.3	(26-31), 28±2
8	10	(22-31), 27.3±2.3	(20-26), 22.8±1.2	(32-44), 37±1.6	(85-115), 93±3.5	(14-27), 23.5±2.6
9	8	(21.5-28), 24.2±1.9	(17-23.5), 19.5±1.4	(33-46), 39.4±1.5	(88-105), 98±2.5	(18-26.5), 23.5±2.4
10	10	(29-34), 26.5±1.2	(24-26), 21±2	(41-48), 42.2±0.9	(93-102), 96±2	(20-28.5), 25.5±2.1
11	11	(30-39.5), 32.7±1.6	(24-28), 25.7±1.1	(35-42.5), 37.5±1.2	(98-115), 112±1.5	(14-22), 15.5±1
12	13	(33.5-42), 35.2±1.4	(23-30.5), 28.6±1.2	(40-48), 45.2±1.5	(104-120), 115±3	(17-23), 19±1.6
13	15	(34.5-38), 36.4±1.3	(28.5-34), 32.7±1	(41-49.5), 45.7±2	(103-127), 117±4.2	(14-21), 16±1.8
14	8	(23-36), 33±1.8	(20.5-29), 24.3±2.1	(36-42), 43.5±0.9	(106-123), 112±3.7	(12-18), 14.8±2.1
15	7	(36-47.5), 41.2±3.1	(26-38.5), 35.1±1.1	(38-54.5), 48.2±2.2	(106-123), 115±3.6	(15-22), 17±1.6
16	10	(30-39), 34.2±2.1	(27-35), 32.1±2	(41-48.5), 44.8±1.4	(107-124), 117±2.8	(15-23), 18.9±2.6
17	12	(32-44), 38.2±3.2	(28-37.5), 33.4±1.8	(47.5-61), 53.7±2.1	(103-129), 116±4	(15-25), 18±2.1
18	11	(28-38.5), 35.4±1.9	(21.5-30), 28.6±0.9	(35-48), 44.3±1.4	(103-118), 113±2	(14-19.5), 16.8±1.9
19	10	(28-36.5), 32.3±2.8	(23-28.5), 25.2±1.3	(39-46), 41.8±0.8	(102-123), 111±3.2	(13.5-22.5), 17±3
20	7	(29-37), 32.5±3	(26-31), 28.5±1	(40-47.5), 43.5±1.5	(109-125), 112±2	(14-18), 15.5±1
21	11	(29-38), 34.6±2.2	(22-32), 27±2	(36-45), 38.6±1.3	(110-128), 115±2.3	(14-17), 15±0.8
22	10	(28.5-39), 34.7±3.3	(22.5-33), 28.4±2.7	(38.5-45), 41±1.2	(102-121), 114±3	(15-19), 17±1.2
23	9	(25.5-36), 30.9±2.4	(24-32), 27.8±2.3	(37-46), 39.8±1.1	(103-115), 111±2	(14-17.5), 16±1.1
24	7	(30-38.5), 34±2.5	(26-35), 29.3±2.1	(37-46), 42.3±2.2	(106-124), 112±3.1	(16-23), 19±2.1
25	8	(30-38.5), 34.6±1.9	(23-31), 27±2	(35-44.5), 42±1.1	(107-128), 112±2.8	(12-18), 15.5±2
26	7	(27-33.5), 31.2±1.8	(21-30), 24.9±2.1	(42-53), 47.5±2.3	(103-128), 115±3.4	(21-25), 22.5±1.2
27	9	(33-42.5), 37.2±2.7	(25-32.5), 27.6±2.3	(39-47.5), 44±1.2	(105-123), 115±2.6	(14-20), 15.6±1.3
28	6	(30-37.5), 35.6±1.9	(26-33.5), 30.8±1.7	(39-51), 45±2	(103-126), 117±3.6	(15-23), 18.3±2.1
29	10	(28.5-39), 34.6±2.7	(27-32.5), 29.7±1.4	(41-48.5), 45.1±1	(106-122), 116±3	(14-22), 16.8±2.2
30	14	(30-38), 33.5±2.9	(25-34), 28±2	(41-54), 49±2.1	(105-124), 112±4.2	(14.5-22), 17±2.5
31	12	(32.5-43), 35.5±2.5	(28-37.5), 32±2.6	(42.5-53), 51±0.9	(102-128), 116±4.5	(15-22.5), 20±1.8
32	8	(28-34), 31.8±2.8	(23-31.5), 26±1.8	(43.5-52), 46.5±1.8	(110-127), 117±2.6	(16-23.5), 20±2.1
33	11	(24-33), 30.5±2.3	(23.5-34), 26.5±2.3	(32-41.5), 38.9±1.7	(102-137), 112±4	(12-18.5), 14±1.7
34	9	(30-35), 31.8±1.1	(23-31.5), 26.1±2	(43-52.5), 49.7±1.3	(106-131), 114±3.6	(13-21), 15±1.5
35	9	(33-42.5), 36.2±2.1	(23-32.5), 25.4±1.3	(38.5-48), 42.3±2.1	(73-98), 89±3	(19-27.5), 22±2.2
36	11	(26.5-34), 32.1±2	(21-27.5), 25.8±1.6	(38-45.5), 40.2±2.2	(80-103), 94±2.9	(19-26), 23±2.7
37	13	(26-33.5), 28.3±1.3	(20-27.5), 24.7±1.7	(35-44.5), 41.7±1.3	(83-106), 91±4.2	(22-31.5), 25±2
38	10	(29-38.5), 31.4±1	(22-31), 25.4±2.7	(35-46.5), 40.2±2.4	(85-100), 92±3.5	(15.5-22), 20±1.5
39	9	(27-34.5), 30.5±1.9	(20-28.5), 23±1.9	(29-41), 34.6±2	(79-96), 84±2	(18-29.5), 23.5±3.1
40	10	(23-32), 28.6±2.7	(17-25), 21.8±2	(39-45), 40.3±0.5	(75-107), 86±3.7	(19.5-27), 24±2.8
41	10	(27-38), 35.1±1.6	(19-26), 23.6±1.6	(35-45.5), 42±1	(77-97), 88±4.3	(21-27), 24.5±2.4
42	11	(32-39), 34.6±1.7	(23-30.5), 26±2.2	(38-43.5), 41.3±1.2	(72-97), 83±2.3	(20-27), 25±1.8
43	12	(30.5-38), 34±2.6	(23-32.5), 26.7±1.8	(41.5-48), 40.4±0.7	(70-98), 79±3.1	(17-23), 21±1.5
44	9	(33-41), 35±1.9	(25-34), 27.7±1	(39-48.5), 42.2±1.2	(72-101), 82±4.8	(15-28.5), 22.4±3.2
45	12	(32-37), 35.1±1.2	(26-32), 28.2±1.3	(40-45), 41.3±0.6	(75-104), 80±2.3	(14-23), 20.4±2.1
46	11	(28-37), 34.7±1.7	(22-31), 27.9±2.3	(36-42), 40±1	(70-86), 77±3.2	(16-24.5), 21.7±2.6
47	14	(32.5-36.5), 34.2±1.1	(23-31.5), 29.5±1	(43-55.1), 52.4±1.1	(102-115), 105±2	(13-21), 14±0.8
48	6	(30.5-48), 42.6±1	(28.5-36), 34.6±1	(39-60.5), 56.2±2.1	(95-122), 105±3.4	(12-18.5), 13±0.6
49	10	(28-37), 34.6±1.7	(22.5-34), 31.8±1.2	(33-57), 47.6±2.4	(95-118), 103±3	(18-26), 21.5±2.3
50	11	(29-38.5), 34.6±1.3	(24-33.5), 31.7±1.1	(40-52), 46.7±2.2	(98-123), 109±4.5	(12.5-21), 15.6±2.1
51	8	(33-45.5), 38.2±1.5	(28-36.5), 34.1±1.4	(42-53.5), 50.2±1	(94-120), 103±4.6	(12-21), 16.5±2.8
52	8	(25-33.5), 27.6±1.4	(17-24), 19.5±1.8	(39.5-48), 46.6±0.9	(70-97), 81±5.1	(15-24), 18±2
53	6	(25-32), 29.1±1.6	(17-21), 18.2±0.8	(37-51), 45.3±2.5	(72-107), 82±4.2	(16-28), 18.4±2.3
54	7	(25-33), 31.7±1.2	(23-31), 25.8±1.6	(37.5-47), 41.7±2	(70-96), 87±3.2	(13-26.5), 19±3.5
55	10	(25-34), 29.5±2.8	(18.5-23), 20±1	(34.5-42), 37±1.1	(86-103), 94±3.6	(13-23), 18±3.1
56	12	(22-31.5), 28.4±1.7	(19-26), 20.4±1.1	(33-42.5), 37.7±2.3	(81-102), 94±4	(14-23), 18±2.5
57	8	(23-35), 28.4±2.9	(19-24.5), 20.1±0.7	(42-51), 48.3±1.2	(71-96), 88±3.8	(14-20), 17±2.3
58	10	(27-34), 31.4±2	(22-27), 25.4±1.2	(36-47), 40.2±2	(77-101), 87±5.1	(18-25), 20±1.5
59	10	(22-31.5), 26.4±2.5	(17-23.5), 19.1±1.3	(37-52.5), 48.1±1.4	(74-99), 83±4.4	(15-22.5), 17.5±2
60	9	(27-42.5), 32±1.8	(20-35.5), 27±2.7	(35-48), 39.7±2.3	(71-96), 88±3.5	(12-20.5), 13.5±1.1
61	7	(30-38.5), 32.3±1.2	(25-31), 27.4±1.4	(34-53), 39.3±2	(75-101), 87±6.1	(12.5-18), 14.3±1.7
62	9	(26-34), 31.3±1.4	(23-29.5), 27.7±1.8	(33-41), 38.3±1.6	(75-98), 86±4.2	(14-23), 15.3±1
63	11	(25-32.5), 31.2±1	(22-28.5), 26.4±2.2	(34-42), 40.3±1.2	(81-93), 88±3.2	(12-21), 14±1.3
64	9	(21.5-32), 27.5±2.1	(19.5-24), 22.5±1.1	(38-46), 40±1	(91-104), 97±3.4	(23.5-30), 27.6±2
65	12	(28-37.5), 32.8±2.4	(24-32.5), 27±2.3	(35-51), 39±2.3	(79-94), 85±3.2	(11-18), 12.8±1
66	6	(31-42.5), 33.3±1.7	(25-34.5), 26.2±0.8	(32-43.5), 39.3±1.4	(80-103), 90±4.3	(12-27), 14±1.4
67	8	(28-37), 32.6±2	(23-31), 27.1±1.6	(36.5-44), 39.1±2	(72-97), 87±3.6	(12-25), 14.7±2.1
68	5	(25-39), 27.4±1.4	(18-27), 22.7±2	(34-57.5), 40.2±2.2	(72-107), 94±5.3	(13-16.5), 14.5±1.1
69	6	(31-42.5), 35.6±2.3	(25-34.5), 31.4±1.6	(42-55.5), 52±1.6	(90-113), 104±3.8	(14-21), 16±1.5

ادامه جدول ۲. مشخصات مورفومتریکی مخروط انتهایی سیست جمعیت‌های مختلف *Heterodera schachtii* (اندازه‌ها به میکرومتر)

Table 2. (Cont.) Morphometric characters of vulval areas of different populations of the *Heterodera schachtii* (Measurements in μm)

70	7	(30-36), 32.6±1	(24.5-29), 26.8±1.6	(47-56), 53.8±0.9	(103-119) 113±4.2	(12-17), 15±1.6
71	9	(40-44), 41.2±0.9	(32-37.5), 35.2±1.3	(50-57.5), 53.7±1	(97-108) 101±3.2	(12.5-18), 15±2
72	12	(31-40), 38.5±0.8	(26-34), 29.1±2	(40-51), 42.3±1.1	(94-109), 98±3	(14-22), 16±1.7
73	10	(30-37.5), 34.6±1.6	(24-31.5), 25.8±0.7	(44-55), 52.8±1.3	(93-126), 116±4	(13.5-23), 15.3±1.5
74	7	(26-34), 28.7±1.2	(18.5-25.5), 19.8±0.6	(40-56.2), 44.6±2.2	(74-94), 84±4.3	(11-20), 17±2.2
75	9	(32-41), 33.2±0.8	(25-36), 27.6±1.3	(41-54), 51.9±1.3	(97-124), 109±5.2	(12-18.5), 14.2±2
76	8	(30.5-43), 33.4±1.8	(25-32.5), 28.4±1.7	(42.5-53), 50.3±1.4	(92-128), 119±4.8	(13-18.5), 16.1±2
77	6	(31-39), 35.2±3	(26-34.5), 27.2±0.5	(46.5-57), 49.4±1.6	(100-112), 106±3.2	(12-21.5), 18.8±1.6
78	11	(31.5-40), 37.7±1.6	(21.2-32), 29.6±1	(41-59.5), 43.6±1.4	(71-96), 83±3.4	(15-28.5), 19±2.9
79	7	(30-41), 32.6±1.1	(23.5-34), 27.9±2.3	(40-51), 42.6±1.1	(105-137), 114±5.3	(16-22.5), 19.3±2.2
80	5	(32-38), 34.6±1.3	(28-33.5), 31.5±1	(39-47.5), 44.6±1	(76-92), 86±3.1	(30-37), 35±1.6
81	10	(32-46.5), 35.3±2.1	(30-37.5), 32.5±1.1	(41-52), 43.4±1.3	(73-94), 84±4.2	(31-38.5), 35.5±1.8
82	13	(34-42.5), 32.7±1	(26-37), 29.4±1.2	(35-46.5), 41.7±2.1	(72-100), 84±6.5	(25-38), 34±2.3
83	12	(32-42.5), 36.7±2.3	(22-31.5), 28.4±1.4	(37-46), 42.4±1.3	(79-96), 88±5.7	(26-39.5), 34.7±3.1
84	14	(30-41), 36.8±3.1	(25.5-37), 34.8±1.2	(42-59), 47.4±2.2	(72-97), 81±6.4	(24-38.5), 32±3.1
85	11	(30-37), 34.8±1.1	(28-34.5), 32.8±1	(39-52.5), 48.3±1.6	(76-92), 85±4.3	(28-37), 31.2±2.3
86	8	(33-46.5), 36±1.6	(31-37.5), 34.9±1.6	(43-58), 45.9±1	(73-104), 89±6.3	(32-38.5), 35±2
87	6	(34-42.5), 37±2.1	(28-37), 30±1	(35-54.5), 48±2	(75-100), 88±6.3	(25-40), 34±2.6
88	9	(32-42.5), 33.8±1	(26-37.5), 35±1.1	(37-51), 47±2.1	(79-96), 85±4.5	(26-39.5), 35.6±3

جدول ۳. مشخصات مورفومتریکی لاروهای سن دوم جمعیت‌های مختلف *Heterodera schachtii* (اندازه‌ها به میکرومتر)

Table 3. Morphometrics characters of the second stage juveniles of different populations of *Heterodera schachtii* (Measurements in μm)

No.	J2s(n)	Length	Stylet Length	Tail Length	Hyaline Length
1	24	(440-510), 475±6.5	(25-26), 25.6±0.2	(35-38), 36.4±0.5	(21-25.5), 24.8±0.6
2	28	(475-504), 481±4.5	(24.5-26), 25.4±0.5	(36.5-41), 38±1.2	(21-25.5), 23.4±0.8
3	18	(470-515), 476.5±5	(24.5-27)25.8±0.1	(39-45), 42.7±1	(25-34), 31±1.2
4	19	(472-528), 486±7.4	(25-26.5), 26.2±0.4	(31-39), 37.6±0.8	(21.5-34), 28.7±1.2
5	27	(462-502), 473±6.5	(25-26.5), 25.8±0.1	(38-43), 41.3±1.3	(20.5-25), 23.6±0.8
6	20	(460-522), 483±5.4	(24-27)26.3±0.3	(38-41), 40±0.7	(22-26)24.5±0.7
7	32	(471-507), 480±4.5	(24-26.5), 25.3±0.4	(34-39.5), 38.7±0.6	(21.5-29), 25.7±1.2
8	24	(465-504), 476±5.8	(25-26)25.7±0.2	(38-44), 42.7±1	(22-28)26.2±1.4
9	23	(470-520), 481±8.3	(24-28), 25.9±0.6	(28-38.5), 35.4±1.4	(23-29.5), 26±0.8
10	26	(481-510), 487±5.2	(24-26), 24.9±0.4	(34-47), 41±1.5	(26-32), 29.6±0.9
11	30	(493-531), 511±4.9	(25-27), 25.4±0.2	(42-57.5), 46.2±1.2	(31-46.5), 36±1.1
12	33	(505-536), 510±4	(24.5-26), 25.3±0.1	(40-49), 44±1.1	(30-35), 32.5±0.6
13	21	(486-521), 508±6.3	(25-27), 25.6±0.3	(36-45.5), 43.5±0.8	(28-37), 33±1
14	28	(489-527), 509±7.2	(25-26.5), 25.9±0.2	(41-58.5), 52.4±1	(34.5-48.5), 35.4±0.6
15	26	(501-533), 512±4.3	(24-26.5), 26.1±0.2	(37-54), 48.6±1.5	(32-39.5), 35.1±0.8
16	24	(490-536), 511±5.5	(25-26.5), 26.3±0.1	(38-57), 49.3±1.1	(31.5-41), 36.4±1.3
17	27	(506-534), 514±6.1	(25-27), 26±0.2	(44-57), 50.4±0.8	(31-43), 36.1±1
18	31	(491-532), 509±4.7	(25-27), 25.8±0.1	(42.5-59), 51.3±1.3	(28.5-41), 37±1.2
19	28	(493-544), 532±6.1	(25-26), 25.8±0.1	(37.5-49), 43.6±1	(21-28.5), 26.8±0.8
20	25	(485-540), 526±6.5	(25-27), 25.4±0.3	(35-47), 38.2±1.2	(22-29.5), 27±0.7
21	24	(502-542), 531±5.3	(25.5-27), 26±0.2	(39-49), 41.6±1.4	(24-31), 26±1
22	20	(498-532), 524±6.7	(25-26), 25.4±0.2	(37-45), 42.3±0.9	(22-30), 25.6±1.2
23	22	(490-545), 527±5.8	(26-27), 26.4±0.1	(32-46), 37.2±1	(20-27), 22.8±0.6
24	23	(504-535), 523±4.6	(25-27.5), 25.8±0.5	(35-46), 41±1.3	(22-34), 25.4±1
25	26	(512-547), 530±6	(25-26), 25.6±0.4	(40-52), 42.5±1.1	(28-37), 32.4±1
26	22	(500-542), 528±7.1	(25-26.5), 26±0.4	(37-42.5), 38.5±0.8	(24-30.5), 25.8±1.2
27	26	(505-534), 520±4.9	(25.5-27), 26.2±0.3	(32.5-39), 36.4±1.4	(22-30.5), 24.7±0.8
28	23	(492-541), 527±8.2	(23.5-28), 26.1±0.1	(34-41.5), 37.4±1.2	(20-28.5), 24.5±1.1
29	31	(501-536), 521±4.1	(25-26.5), 25.4±0.3	(35-43.5), 38.6±1	(22.5-30), 24.5±1
30	35	(510-556), 531±6.2	(26.5-28), 27.2±0.2	(35-43), 39.8±1.1	(25.5-34), 28.6±1
31	28	(489-552), 532±4.7	(26.5-28), 27.5±0.2	(36-44.5), 39±0.8	(21-26.5), 24.8±0.8
32	27	(515-546), 527±5.6	(24.5-26.5), 25.5±0.1	(35.5-42.5), 37.8±1.3	(22.5-29), 26.7±1.2
33	29	(512-548), 535±7.3	(25.5-27), 26.5±0.2	(36.5-49), 43.7±1.2	(31.5-38.5), 35.2±1
34	23	(510-552), 528±4.5	(25.5-27), 26.2±0.4	(36-44.5), 42.5±0.7	(31-38.5), 34.7±1.1

ادامه جدول ۳. مشخصات مورفومتریکی لاروهای سن دوم جمعیت‌های مختلف *Heterodera schachtii* (اندازه‌ها به میکرومتر)

Table 3. (Cont.) Morphometrics characters of the second stage juveniles of different populations of *Heterodera schachtii* (Measurements in μm)

35	21	(500-548), 512±4.3	(25-26.5), 25.7±0.3	(38.5-48), 42.6±1	(22.5-34), 28.1±1.2
36	22	(489-522), 509±3.8	(25-26), 25.7±0.3	(38-46.5), 43.7±1.1	(23-29.5), 27.3±0.9
37	27	(486-538), 509±6.5	(25.5-27), 26.1±0.1	(40-46.5), 42.7±1	(24-32), 27.4±0.8
38	33	(490-542), 513±5.1	(24-26), 25.1±0.1	(37-47.5), 43.1±0.9	(23-30), 27.7±1
39	30	(493-532), 502±6	(25.5-27.5), 26.8±0.3	(40-46.5), 44±1.4	(26-35.5), 33±1.1
40	24	(493-552), 509±3.9	(25-26.5), 26.1±0.1	(38-49), 42.1±1	(22-32), 27.6±1.5
41	23	(472-540), 510±7.2	(25.5-26.5), 26±0.2	(40-51), 42.3±1	(27-35), 31.2±0.6
42	22	(485-530), 514±4.6	(24.5-27), 26.2±0.2	(38-42.5), 40.7±1.2	(25-33.5), 28.7±1
43	28	(492-531), 502±7.1	(24-26), 24.9±0.1	(43-51.5), 47.3±0.9	(24.5-34), 31.2±1.4
44	24	(462-538), 504±5	(24-25), 24.3±0.2	(42.5-52), 46.7±1	(27-35), 32.1±1.3
45	25	(486-530), 508±6.5	(24-25), 24.2±0.1	(40-49), 45.2±1.1	(29-34), 30.4±1
46	24	(496-540), 512±4.5	(24-26), 24.3±0.1	(40-54), 47±1.4	(21-38), 31.7±0.9
47	21	(426-492), 440±6.7	(25.5-27), 26.3±0.3	(34-47.5), 39±1.3	(24-34.5), 28.6±1.4
48	28	(430-483), 448±4.3	(24-27), 24.2±0.1	(32-46.5), 37.8±1	(21.1-34), 26.7±0.8
49	29	(415-485), 450±3.5	(24.5-26), 25.4±0.2	(35-50), 40±0.8	(21-30), 27.3±1
50	30	(412-490), 446±7.5	(25-26.5), 26.2±0.2	(38-45.5), 41.8±1.2	(23-32.5), 29.3±0.8
51	35	(417-459), 443±5.8	(25.5-27), 26.3±0.2	(34-46.5), 39.4±0.8	(28-34.5), 30.7±0.6
52	23	(404-462), 424±4.3	(25-26.5), 25.4±0.1	(41-46), 44.6±1	(26.5-34), 29.7±1.3
53	27	(385-450), 429±3.5	(25-26), 25.2±0.1	(39-48), 44.2±0.8	(26-33), 30.8±1
54	24	(390-441), 420±5.1	(25-26.5), 25.4±0.1	(36-52.5), 43.8±1.2	(25.5-34), 30.6±1.1
55	26	(410-468), 430±4.9	(25-27), 25.3±0.1	(37.5-48.5), 44.6±1.2	(23-36), 31.6±1.4
56	23	(415-482), 428±4	(25-26), 25.7±0.2	(35.5-47), 44.4±1	(26.5-34), 31.2±1.2
57	26	(412-446), 420±3.5	(25-26), 25.8±0.1	(38.5-46), 41±1.1	(27.5-38), 29±0.8
58	27	(405-452), 423±6	(24.5-26), 25.1±0.3	(41-49.5), 43.1±1.5	(28-37.5), 31.2±0.6
59	25	(404-464), 423±4.3	(25-27), 25.7±0.5	(38.5-45), 41.7±0.7	(23.5-35), 28.7±1.2
60	26	(408-442), 415±3.8	(25-27), 26.5±0.2	(40-53.5), 42.5±1.2	(28.5-38.5), 30.5±0.8
61	28	(406-442), 418±5	(25-27), 26.1±0.4	(40-54.5), 42±1.3	(29-40.5), 32.5±1
62	29	(405-455), 418±4.5	(25-27), 26.8±0.1	(35-50), 41.4±1.2	(21-34), 31.5±1
63	30	(402-460), 421±6.2	(25-26.5), 26.3±0.2	(38-45.5), 40.1±1	(25-36.5), 33.5±1.4
64	25	(480-505), 489±3.5	(25-26.5)25.5±0.3	(34-41), 38.7±0.8	(23.5-29), 28.2±0.5
65	35	(387-459), 423±6.2	(25-27), 25.3±1	(41-46.5), 42.8±1.3	(28-34.5), 31.6±1.2
66	22	(400-468), 427±4	(25-27.5), 26.7±0.4	(37-46), 43±1.2	(26.5-34), 32.1±1
67	19	(406-458), 428±5.1	(25.5-27), 26±0.4	(34-43.5), 39.8±1	(23-34.5), 31.7±1.2
68	25	(432-478), 439±4	(24-26.5), 26.1±0.2	(35-47), 41±1.1	(24.5-33.5), 31.7±1
69	22	(415-488), 450±6.3	(25-26.5), 25.2±0.1	(37-42), 40.7±0.8	(22.5-30), 25.7±0.8
70	22	(430-485), 461±5.2	(25-27), 25.9±0.3	(32-46), 37.5±0.9	(20-27), 23.6±1.3
71	26	(412-467), 437±4.5	(25.5-27), 26.3±0.2	(31-42), 36.4±0.7	(20-28), 23.4±1
72	22	(420-482), 453±5.3	(25-26.5), 25.4±0.1	(36-44.5), 38.4±1.3	(24-33), 26.4±1.1
73	23	(392-461), 451±3.8	(24.5-26), 25.6±0.2	(34-41.5), 35.5±0.9	(20-28.5), 22.6±1
74	33	(421-463), 431±7	(25-27), 26.1±0.3	(35.5-47.5), 44±1	(23.5-34), 28.9±1.4
75	35	(420-486), 447±5.5	(23-25.5), 23.1	(33-41), 34.6±0.7	(19-27), 24.1±0.9
76	28	(439-472), 450±3.7	(23-25), 23.7±0.2	(38-44.5), 33.3±1.2	(21-26.5), 23.1±1.2
77	27	(435-476), 465±3.5	(24.5-26.5), 25.2±0.1	(32.5-38.5), 34.1±1	(20-27), 25.2±0.6
78	32	(411-466), 437±5.7	(25-27.5), 26.3±0.3	(37.5-46), 44.1±0.8	(26-32.5), 29.8±0.7
79	29	(442-488), 453±4	(25-26.5), 25.8±0.2	(32-39), 34.3±0.8	(21-27.5), 24.3±1
80	23	(430-485), 446±6.1	(25-26.5), 25.7±0.2	(36-44.5), 37±1	(25-30.5), 28.6±0.6
81	21	(412-468), 442±7.3	(25-26.5), 25.7±0.1	(32.5-38), 34.8±1.1	(25-34), 27.5±1.2
82	33	(420-482), 445±5.1	(25-27), 26.2±0.3	(34-41.5), 36.7±0.9	(23-28), 25±1
83	30	(430-472), 448±7.5	(25.5-27), 26±0.1	(30-46.5), 33.1±0.8	(18.5-32.5), 25.2±0.7
84	29	(442-488), 453±4.3	(25-27), 26.3±0.1	(32-39), 36.5±1.3	(19-26.5), 24.8±1
85	23	(430-485), 456±5	(25.5-27), 26.2±0.2	(34-44.5), 36.8±1	(23-26.5), 24.4±0.8
86	21	(412-478), 452±4.5	(25.5-27.5), 26.7±0.2	(32.5-42), 37.4±1	(22-34), 26.3±1.2
87	33	(422-482), 443±3.9	(25-26.5), 25.9±0.1	(34-41.5), 35.4±0.9	(23-31), 28±1
88	30	(430-472), 454±6	(25.5-27), 26.6±0.2	(30-42.5), 36±1.1	(24-32.5), 27±0.9

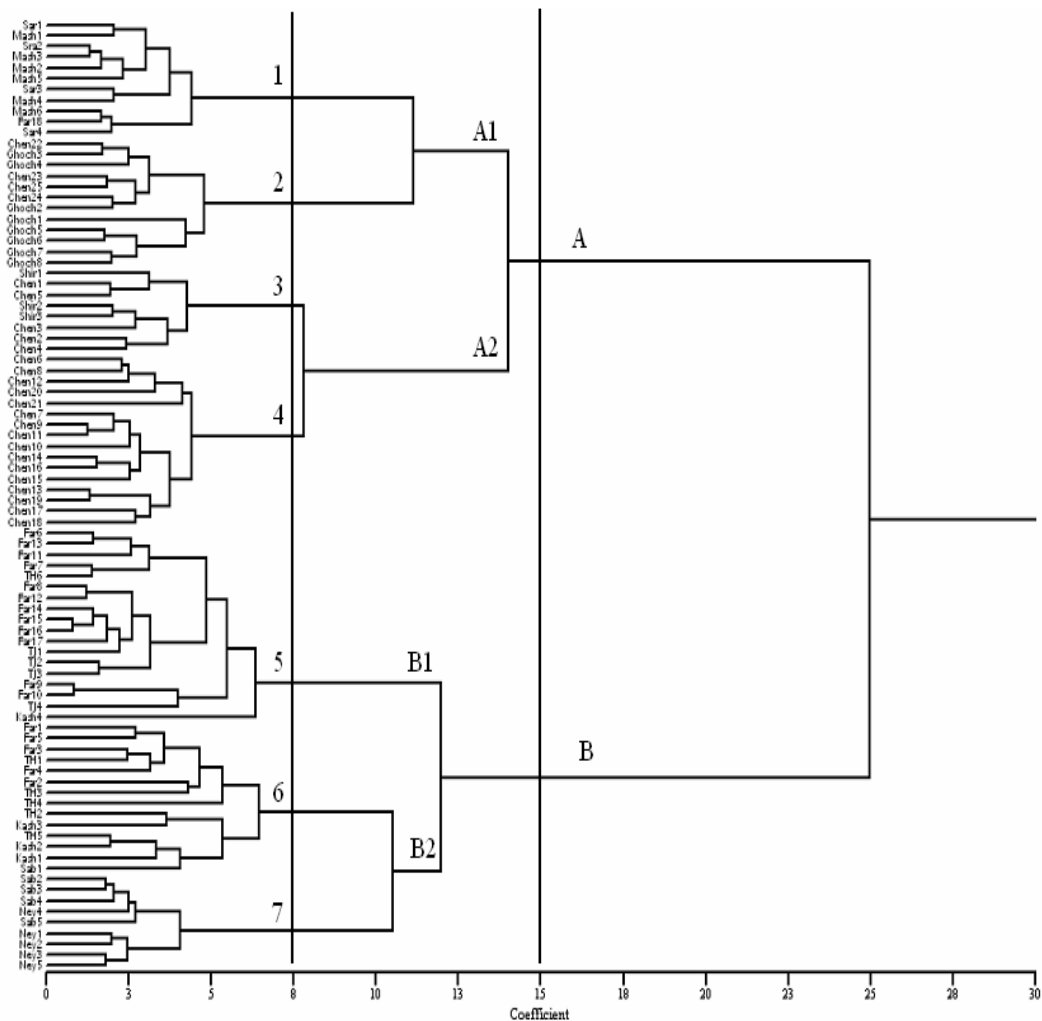
در دمای 72°C (گسترش) به تعداد ۳۵ دور و در نهایت ۵ دقیقه در دمای 72°C (گسترش نهایی) بود. جهت انجام آزمون RFLP، محصول PCR، با آنزیم برشی *MvaI* هضم شد. برای این منظور مواد مورد نیاز طبق دستورالعمل کارخانه مربوطه (Fermentase) مخلوط شدند و به مدت ۱۶ ساعت در حمام آب گرم 37°C قرار گرفتند. پس از انجام واکنش از هر نمونه مقدار $7\mu\text{l}$ در ژل آگارز $1/1/7\%$ ، در ولتاژ ۷۵ و به مدت ۲ ساعت تفکیک شد و رنگ‌آمیزی با استفاده از محلول اتیدیوم بروماید انجام گرفت. لازم به ذکر است که برای آزمون کارایی روش مولکولی مورد استفاده در این تحقیق، در بعضی از نمونه‌ها که سیستم‌ها خالی از تخم و لارو بودند، لاروها به طور مستقیم از خاک استخراج شدند که نتایج به دست آمده مشابه نتایج سایر نمونه‌ها بود که مستقیماً از تخم و لاروهای داخل سیستم‌ها به دست آمده بود. در نمونه‌های انتخاب شده، سیستم‌ها یا به طور مستقیم از ریشه گیاه یا از خاک اطراف یک گیاه در اواسط یا اواخر فصل جدا شدند که مزارع مورد نظر بین دو تا سه سال تحت کشت مداوم چغندرقد قرار داشتند.

نتایج و بحث

داده‌های مرفومتريکی به دست آمده بر اساس نه صفت مهم که معمولاً برای شناسایی نماتودهای سیستمی مورد استفاده قرار می‌گیرند، در جدول‌های ۲ و ۳ آورده شده است. هم‌چنین نتایج به دست آمده از گروه‌بندی داده‌های مرفومتريکی به صورت یک دندروگرام با استفاده از روش UPGMA و براساس ماتریس فاصله‌ها ترسیم شده است (شکل ۱). در این دندروگرام در سطح تفاوت $1/8\%$ ، هفت گروه مختلف قابل مشاهده است که به خوبی از هم تفکیک شده‌اند. در گروه (۱) در مجموع ۱۱ جمعیت قرار

انجام شد. برای این منظور ابتدا حداقل، حداکثر، میانگین و ضریب تغییرات داده‌های مربوطه تعیین شد و سپس برای گروه‌بندی از میانگین داده‌ها استفاده شد. برای استخراج DNA ژنومی از روش (Tanha Maafi *et al.* 2003) با اندکی تغییرات استفاده شد. تعدادی لارو سن دوم به میکروتیوب $0/2$ میلی‌لیتری حاوی $8\mu\text{l}$ آب مقطر دو بار تقطیر منتقل شدند. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 80°C قرار داده شدند، سپس لاروها با استفاده از ورتکس خرد شدند. در این مرحله مقدار $10\mu\text{l}$ بافر استخراج (100 mM Tris-HCl pH 8، 500 mM KCl، 15 mM MgCl_2 ، 4.5% و 0.05% Tween 20، به آنها اضافه شد.

پس از افزودن $2\mu\text{l}$ پروتئیناز K ($600\mu\text{g/ml}$) میکروتیوب‌ها در ترموسایکلر به مدت یک ساعت در دمای 65°C و ۱۰ دقیقه در دمای 95°C قرار داده شدند. بعد از انجام سانتریفیوژ به مدت دو دقیقه با 13000 دور در دقیقه، نمونه‌ها در فریزر 20°C قرار داده شدند. جهت انجام واکنش PCR از آغازگر رفت و برگشت 5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3' و 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3' AB28 که برای تکثیر نواحی کامل ITS1+5.8S+ITS2 و بخش‌هایی از 18S و 28S طراحی شده‌اند، استفاده شد (Joyce *et al.*, 1994). اجزای واکنش PCR شامل $2/5\mu\text{l}$ بافر PCR ($10\times$)، $1\mu\text{l}$ کلرور منیزیوم (MgCl_2)، 25 mM ، $0/5\mu\text{l}$ dNTPs، 10 mM ، $1\mu\text{l}$ DNA الگو، $1\mu\text{l}$ از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، $0/3\mu\text{l}$ آنزیم *Taq* و $17/7\mu\text{l}$ آب مقطر استریل (حجم نهایی $25\mu\text{l}$) بود. برنامه مورد استفاده شامل ۴ دقیقه در دمای 94°C (واسرشت اولیه) و به دنبال آن ۱ دقیقه در دمای 94°C (واسرشت)، $1/5$ دقیقه در دمای 62°C (اتصال) و ۲ دقیقه



شکل ۱. دندروگرام حاصل از گروه‌بندی جمعیت‌های مختلف *Heterodera schachtii* براساس روش UPGMA. جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان خراسان رضوی

Fig. 1. Dendrogram constructed by clustering of different populations of *Heterodera schachtii*, based on UPGMA analyses, collected from different localities of Khorasan Razavi province

می‌باشد، سایر جمعیت‌های مربوط به چناران قرار گرفته‌اند. گروه (۵) در بر دارنده ۱۸ جمعیت می‌باشد که شامل جمعیت‌هایی از فریمان، تربت حیدریه، تربت جام و یک جمعیت از کاشمر می‌باشد. گروه (۶) نیز شامل جمعیت‌هایی از فریمان، تربت حیدریه، بقیه جمعیت‌های کاشمر و نیز یک جمعیت از سبزوار می‌باشد و در نهایت، گروه (۷) شامل بقیه جمعیت‌های سبزوار به اضافه

گرفته است که مربوط به جمعیت‌های جمع‌آوری شده از سرخس، مشهد و یک جمعیت از فریمان می‌باشد. در گروه (۲)، ۱۲ جمعیت که شامل جمعیت‌های مربوط به قوچان و تعدادی از جمعیت‌های چناران هستند. در گروه (۳) که شامل ۸ جمعیت است، جمعیت‌های جمع‌آوری شده از شیروان به همراه تعداد دیگری از جمعیت‌های چناران قرار گرفته‌اند. هم‌چنین در گروه (۴) که شامل ۱۶ جمعیت

تعداد برجستگی‌های گره مانند (Bullae) اطراف آن می‌توان چهار حالت را در نظر گرفت. در حالت اول که در گروه (۵) وجود دارد، طول باندهای کوتیکولی ناحیه واژن نسبتاً کوتاه و کمتر از ۹۰ میکرومتر می‌باشد و برجستگی‌های گره مانند به تعداد بسیار محدود وجود دارند (شکل ۲). در حالت دوم طول باندهای کوتیکولی ناحیه واژن کوتاه و کمتر از ۹۰ میکرومتر می‌باشد ولی برجستگی‌های گره مانند به تعداد قابل توجه وجود دارند (شکل ۳). این حالت در گروه‌های (۲) و (۷) دیده می‌شود. در حالت سوم طول باندهای کوتیکولی ناحیه واژن نسبتاً بلند و در حدود ۱۰۰ میکرومتر و برجستگی‌های گره مانند به تعداد بسیار محدود وجود دارند (شکل ۴) که این حالت در گروه‌های (۱) و (۶) دیده می‌شود. در حالت چهارم که در گروه‌های (۳) و (۴) قابل مشاهده است، طول باندهای کوتیکولی نگهدارنده واژن بسیار بلند و بیشتر از ۱۱۰ میکرومتر و برجستگی‌های گره مانند به تعداد زیاد و به صورت متراکم در کنار هم دیده می‌شوند (شکل ۵). لازم به ذکر است که برجستگی‌های گره مانند می‌توانند به شکل گرد (شکل A۶)، بلند و نوک تیز (شکل B۶) و یا دندان‌دار (شکل C۶) باشند که گروه‌بندی ارائه شده با شکل برجستگی‌های گره مانند قابل توجیه نیست و در یک جمعیت، حتی در یک مخروط انتهایی بدن سیستم ممکن است دو شکل از برجستگی‌های گره مانند وجود داشته باشد. طول و عرض پنجره‌های خروجی لارو و طول فرج در ایجاد گروه‌ها نقش زیادی نداشتند و نقش آنها بیشتر در ایجاد تنوع درون گروه‌ها بود. براساس این صفات می‌توان دو حالت کلی را برای مخروط انتهایی بدن سیستم‌ها در نظر گرفت. در حالت اول طول فرج بسیار بیشتر از عرض پنجره‌های خروجی لارو می‌باشد (شکل A۷) و در حالت دوم طول فرج تقریباً هم اندازه با عرض پنجره‌های

جمعیت‌های جمع‌آوری شده از نیشابور است. گروه‌های ذکر شده دارای ۹۲٪ شباهت می‌باشند. در بین گروه‌های مربوطه، هیچ گروهی به تنهایی در بردارنده جمعیت‌های یک منطقه نمی‌باشد، به جز گروه (۴) که تعداد زیادی از جمعیت‌های مربوط به چناران را دارا می‌باشد و سایر جمعیت‌های این منطقه در گروه‌های (۲) و (۳) قرار گرفته‌اند. پس می‌توان گفت که گروه‌های مذکور بر اساس مناطق جغرافیایی از هم تفکیک نشده‌اند ولی با افزایش سطح تفاوت تا سطح ۱۵٪ دو گروه اصلی A و B قابل تشخیص است که در گروه A جمعیت‌های جمع‌آوری شده از شهرهای سرخس، مشهد، چناران، قوچان و شیروان به همراه یک جمعیت از فریمان قرار گرفته‌اند و در گروه B جمعیت‌های مربوط به شهرهای فریمان، تربت حیدریه، تربت جام، کاشمر، سبزوار و نیشابور مشاهده می‌شوند. شهرهای قرار گرفته در گروه اصلی A در مناطق شمالی استان خراسان رضوی قرار گرفته‌اند و شهرهای گروه اصلی B در مناطق جنوبی‌تر قرار دارند و می‌توان گفت که جمعیت‌های مناطق مختلف بر این اساس از هم تفکیک شده‌اند. در بین ۹ صفت مورد بررسی، به ترتیب طول و عرض باندهای کوتیکولی نگهدارنده واژن بیشترین نقش را در ایجاد گروه‌های مذکور داشته‌اند و بعد از این صفات به ترتیب طول و عرض پنجره‌های خروجی لارو و طول فرج، طول بدن لارو، طول دم و منطقه شفاف انتهایی دم و در نهایت طول استایلت در مرتبه بعدی تاثیرگذاری در تفکیک جمعیت‌های مختلف قرار دارند. حداقل، حداکثر و میانگین داده‌های مرفومتریکی مربوط به لاروهای سن دوم و مخروط انتهایی بدن در هفت گروه ایجاد شده در جدول‌های ۴ و ۵ آورده شده است. براساس طول باندهای کوتیکولی ناحیه واژن که بیشترین نقش را در ایجاد گروه‌های مذکور داشته و نیز

جدول ۴. حداقل، حداکثر و میانگین داده‌های مورفومتریکی لاروهای سن دوم در گروه‌های ارائه شده (اندازه‌ها به میکرومتر)

Table 4. Minimum, maximum and average of morphometrical data of second stage juveniles in constructed groups (Measurements in μm)

Group	L	Styllet	Tail	Hyaline
G1	(473-489), 480.68	(24.9-26.3), 25.67	(35.4-42.7), 39.31	(23.4-31), 26.51
G2	(502-514), 508.66	(22.3-26.8), 25.2	(40.7-47.3), 43.95	(27.3-33), 29.7
G3	(508-514), 510.5	(25.3-26.3), 25.8	(43.5-52.4), 48.21	(32.5-37), 35.18
G4	(520-535), 527.62	(25.4-27.5), 26.06	(36.4-43.7), 40.06	(22.8-35.2), 27.21
G5	(415-439), 425.22	(25.1-26.8), 25.87	(39.8-44.6), 42.67	(28.7-33.5), 30.92
G6	(437-465), 449.60	(23-26.3), 25.32	(33.3-41.8), 37.34	(22.6-30.7), 25.78
G7	(442-456), 448.77	(25.7-26.7), 26.14	(33.1-37.4), 35.96	(24.4-28.6), 26.31

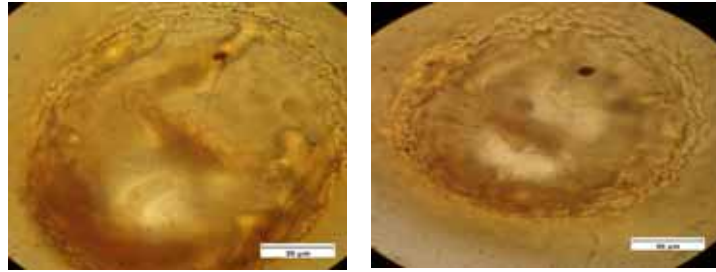
جدول ۵. حداقل، حداکثر و میانگین داده‌های مورفومتریکی مخروط انتهایی بدن در گروه‌های ارائه شده (اندازه‌ها به میکرومتر)

Table 5. Minimum, maximum and average of morphometrical data of vulval areas in constructed groups (Measurements in μm)

Group	FL	FW	VSL	U L	U W
G1	(23-29.8), 25.76	(18-25.2), 21.1	(33.5-42.2), 38	(93-98), 96.45	(23.5-28), 25.28
G2	(28.3-36.2), 32.96	(21.8-28.2), 25.51	(34.6-42.3), 40.54	(77-94), 85.41	(20-25), 22.70
G3	(32.7-41.2), 35.78	(24.3-35.1), 30.06	(37.5-53.7), 45.36	(112-117), 114.62	(14.8-19), 17
G4	(30.5-37.2), 33.45	(24.9-32), 27.83	(38.6-51), 44.10	(111-117), 113.81	(14-22.5), 17.13
G5	(26.4-37.7), 30.65	(18.2-29.6), 23.85	(37-48.3), 41.57	(81-94), 87.11	(12.8-20), 16.38
G6	(32.6-42.6), 35.79	(25.8-35.2), 30.07	(42.3-56.2), 50.13	(98-119), 107.5	(13-21.5), 16.16
G7	(32.7-37), 35.3	(28.4-35), 32.14	(41.7-48.3), 45.41	(81-89), 85.55	(31.2-35.6), 34.11

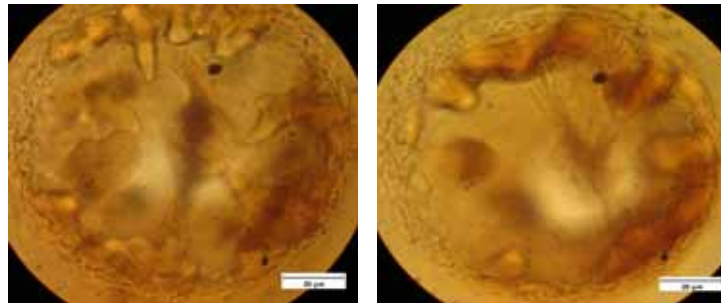
گونه *H. schachtii* مورد استفاده قرار گیرد، حالت لویبایی شکل پنجره‌های خروجی لارو و وجود بوله مخرجی است که صفت دوم، صفت بسیار مهمی می‌باشد، ولی در جمعیت‌های مورد بررسی در مواردی حالت مورد نظر در پنجره‌های خروجی لارو وجود نداشت و عرض پنجره‌ها دارای مقداری کشیدگی بود و حالتی شبیه گونه‌های مشابه به *H. schachtii* مخصوصاً گونه *H. trifolii* را تداعی می‌کرد. هم‌چنین در بسیاری از موارد بوله مخرجی تشخیص داده نشد. از این رو در بعضی از جمعیت‌ها صفات مرفولوژیکی و مورفومتریکی برای شناسایی کافی نبودند و لزوم استفاده از روش‌های

خروجی لارو یا کمی بیشتر از آن است (شکل ۷ B). در هر کدام از گروه‌ها هر دو حالت می‌توانند همزمان وجود داشته باشند. طول بدن لارو، طول دم و ناحیه شفاف انتهایی دم و نیز طول استایلت، نیز تأثیری در گروه‌بندی نداشتند. طول بدن در گروه‌های (۲)، (۳) و (۴) نسبتاً زیاد و بیشتر از ۵۰۰ میکرومتر و در بقیه گروه‌ها کوتاه و کمتر از ۵۰۰ میکرومتر بود. طول دم و ناحیه شفاف انتهایی دم تغییرات زیادی نداشتند و می‌توان گفت که طول این دو قسمت، ارتباطی با طول بدن نداشت. طول استایلت نیز تغییرات زیادی نداشت و فقط باعث ایجاد تنوع در درون گروه‌ها شد. صفات مرفولوژیکی مهمی که می‌تواند برای تشخیص



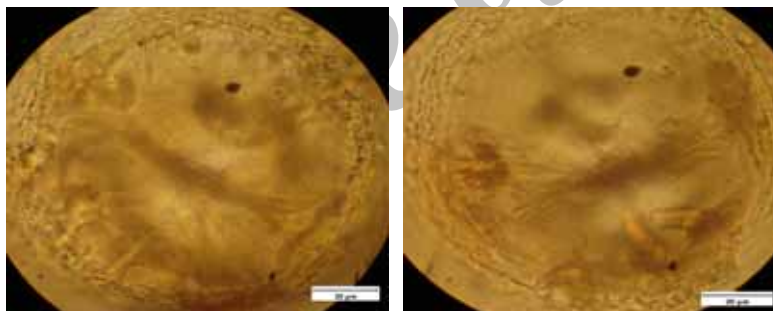
شکل ۲. مخروط انتهایی بدن با باندهای کوتیکولی ناحیه واژن کوتاه و تعداد محدود برجستگی‌های گره مانند

Fig. 2. Vulval areas with short underbridge and rare bullae



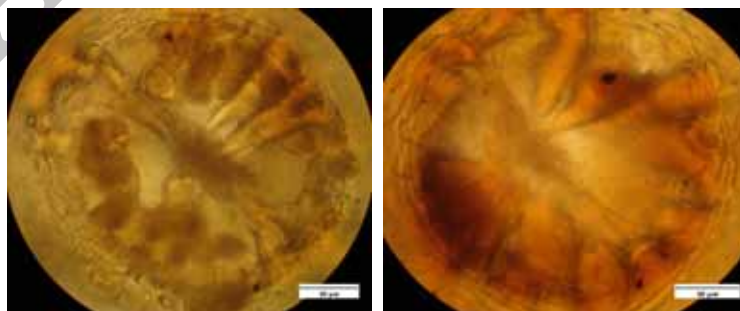
شکل ۳. مخروط انتهایی بدن با باندهای کوتیکولی ناحیه واژن کوتاه و تعداد زیاد برجستگی‌های گره مانند

Fig. 3. Vulval areas with short underbridge and more bullae



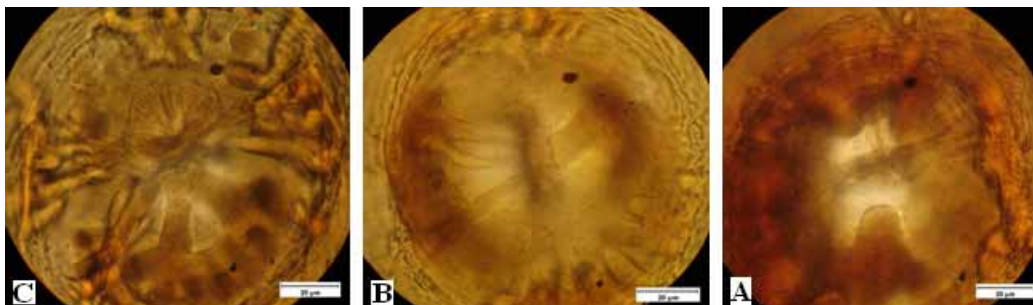
شکل ۴. مخروط انتهایی بدن با باندهای کوتیکولی ناحیه واژن بلند و تعداد محدود برجستگی‌های گره مانند

Fig. 4. Vulval areas with long underbridge and rare bullae



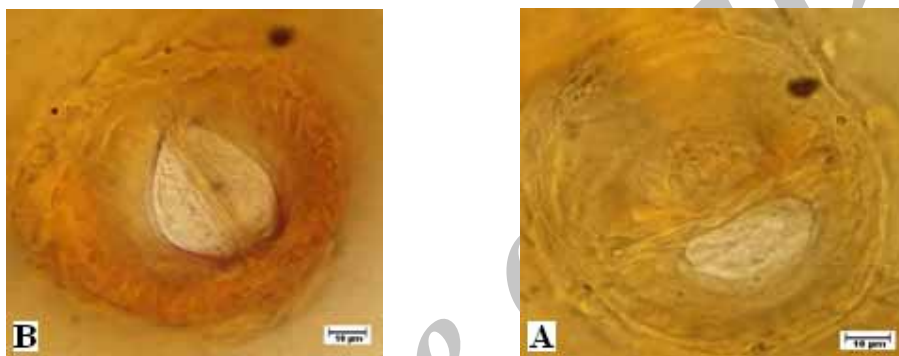
شکل ۵. مخروط انتهایی بدن با باندهای کوتیکولی ناحیه واژن بلند و تعداد زیاد برجستگی‌های گره مانند

Fig. 5. Vulval areas with long underbridge and more bullae



شکل ۶. انواع مختلف برجستگی‌های گره مانند در جمعیت‌های مختلف *Heterodera schachtii*. شکل A: گرد، شکل B: بلند و نوک تیز، شکل C: دندانه دار

Fig. 6. Different shape of bullae in different populations of *Heterodera schachtii*, A: swollen, B: long and pointed, C: indented.

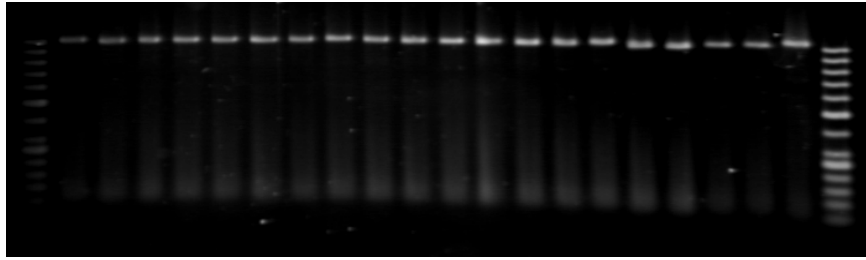


شکل ۷. شکل‌های مختلف ارتباط بین طول و عرض پنجره‌های خروجی لارو و طول فرج. A: طول فرج بیشتر از عرض پنجره‌های خروجی لارو. B: طول فرج هم اندازه با عرض پنجره‌های خروجی لارو یا کمی بیشتر از آن.

Fig. 7. Different shape of Fenestral length and width with vulval slit length A: vulval slit length longer than fenestral width B: vulval slit length equal or to some extent longer than fenestral width

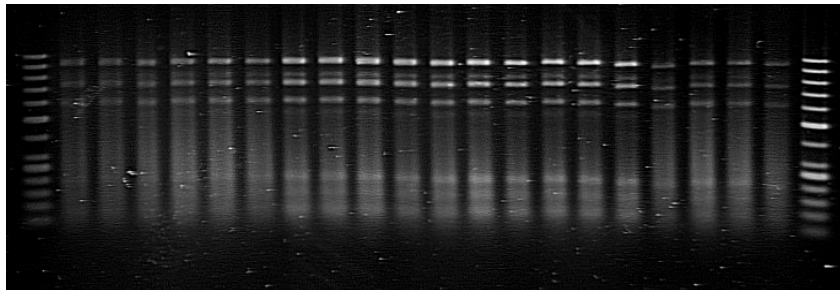
که می‌تواند کاری وقت‌گیر باشد. هم‌چنین جایگزینی DTT با مرکاپتواتانول سبب افزایش بازده کار شد، هر چند که مرکاپتواتانول تا حدی سمی است و در کار با آن باید احتیاط لازم صورت گیرد. روش فوق کارایی لازم برای استخراج DNA از تکه‌ای از بدن یک نماتود را هم دارد و در مواردی که تعداد محدودی از یک گونه نماتود موجود است یا اینکه امکان استفاده از توده نماتود وجود ندارد، به خوبی کارایی دارد (Mokaram Hesar *et al.* 2010). لازم به ذکر است که روش فوق علاوه بر نماتود در مورد حشرات از جمله کنه‌ها نیز مورد استفاده قرار گرفته

مولکولی محسوس بود. گروه‌بندی ذکر شده بعد از تأیید گونه از طریق روش مولکولی در مورد جمعیت‌های مختلف مورد بررسی، انجام گرفت. روش مورد استفاده برای استخراج DNA ژنومی براساس روش تنها معافی و همکاران (Tanha Maafi *et al.*, 2003) با مقداری تغییرات انجام شد. در روش مورد استفاده، برای شکستن دیواره بدن لاروهای سن دوم از سرما و ورتکس استفاده شده است در حالی که در روش مرجع، این کار از طریق تکه تکه کردن لاروها روی اسلاید شیشه‌ای و نیز استفاده از Microhomogeniser Vibro Mixer صورت می‌گیرد



شکل ۸. محصول PCR مربوط به جمعیت‌های مختلف *H. schachtii* قبل از هضم آنزیمی ، Ladder 50bp - L

Fig. 8. PCR band produced in different populations of *Heterodera schachtii* before digestion with restriction enzyme, Ladder: 50bp



شکل ۹. الگوی برشی مربوط به جمعیت‌های مختلف *H. schachtii* بعد از هضم آنزیمی توسط *MvaI* ، Ladder 50bp - L

Fig. 9. Restriction pattern of different populations of *Heterodera schachtii* produced by *MvaI*, Ladder: 50bp

سپاسگزاری

نویسندگان از آقای دکتر Sergei Subbotin از دانشگاه ریورساید کالیفرنیا و خانم دکتر Virginia Fries از دانشگاه پورودو، به خاطر راهنمایی‌های علمی ارزشمندشان قدردانی می‌نمایند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (137-139) متن انگلیسی مراجعه شود

و نتیجه قابل قبولی در پی داشته است (Keivanloo *et al.* 2010). تکثیر ناحیه ITS1+5.8S+ITS2 توسط جفت آغازگرهای TW81 و AB28 برای جمعیت‌های مختلف گونه *H. schachtii* باند حدود ۱۰۴۰ جفت باز را تولید کرد و پس از هضم قطعه مورد نظر توسط آنزیم برشی *MvaI* الگوی برشی مورد نظر برای گونه *H. schachtii* متشکل از ۷ باند ایجاد شد. باند مورد نظر قبل از هضم (شکل ۸) و بعد از هضم (شکل ۹) برای تعدادی از نمونه‌ها نشان داده شده است. این امر تأییدی است بر کار امیری و تنها معافی و نشان می‌دهد که می‌توان از این روش به راحتی و در زمانی کم برای تایید گونه *H. schachtii* استفاده کرد.