

تعیین پاتوتیپ و خصوصیات مولکولی تعدادی از جمعیت‌های ایرانی نماتد سیستی سیب‌زمینی (*Globodera rostochiensis*) و تأثیر ارقام مقاوم و حساس بر تفریح تخم*

شیلا رهبری^۱، زهرا تنها معافی^{۲*}، علی اسکندری^۱ و مزدشت گیتی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۱)

چکیده

نماتد سیستی سبب‌زمینی، *Globodera rostochiensis* در سال ۱۳۸۷ از مزارع سبب‌زمینی شهرستان بهار در استان همدان گزارش شد. جهت تعیین پاتوتیپ *G. rostochiensis*، تعداد ده جمعیت از مزارع آلوده سبب‌زمینی در منطقه بهار جمع‌آوری شد. شناسایی گونه بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی لاروهای سن دوم و سیست‌ها و با استفاده از آغازگر اختصاصی گونه و تعیین ترادف نوکلئوتیدی ناحیه D2-D3 از ژن زیر واحد بزرگ ریبوزومی RNA صورت گرفت. به منظور تعیین پاتوتیپ نماتد، چهار رقم سبب‌زمینی شامل دزیره، مارفونا، اگریا و ساتنه با جمعیت اولیه 1 ± 6 تخم و لارو در گرم خاک مایه‌زنی و در شرایط اتافک رشد با دمای ۱۸ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت سه ماه نگهداری شدند. بر اساس نتایج ارزیابی مقاومت و حساسیت نسبی ارقام مورد آزمایش، پاتوتیپ نماتد سیستی سبب‌زمینی در منطقه بهار استان همدان پاتوتیپ Ro1 تشخیص داده شد. ناحیه D2-D3 از ژن 28S-rRNA در تعداد هشت جمعیت تکثیر و تعیین توالی شد. توالی‌های به دست آمده با ترادف‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های موجود در بانک جهانی ژن (GenBank) مقایسه و درخت تبارزایی ترسیم گردید. تأثیر ارقام حساس مارفونا و دزیره و ارقام مقاوم اگریا و ساتنه نسبت به پاتوتیپ Ro1 بر میزان تفریح تخم نماتد سیستی سبب‌زمینی بعد از سه ماه نشان داد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین ارقام از نظر میزان تفریح تخم و خروج لارو سن دوم از سیست در اکثر آزمایش‌ها وجود ندارد و کلبه ارقام از این نظر در یک گروه آماری قرار گرفتند.

کلیدواژه: همدان، سبب‌زمینی، *Globodera rostochiensis*، 28S rDNA

* بخشی از رساله کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: tanhamaafi@iripp.ir, zahrata.maafi@yahoo.com

۱. به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان.
۲. دانشیار بخش تحقیقات نماتدشناسی، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
۳. مربی پژوهش، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، همدان، ایران.

Pathotype and molecular characteristics of some Iranian potato cyst nematode populations, *Globodera rostochiensis* and impact of the resistant and susceptible potato cultivars on egg hatching*

S. Rahbari¹, Z. Tanha Maafi^{2**}, A. Eskandari¹, and M. Gitty³

(Received: 28.12.2015; Accepted: 22.7.2016)

Abstract

Potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis* was reported from potato fields of Bahar County in Hamadan Province in 2008. In order to determine the pathotype of potato cyst nematode, ten populations of potato cyst nematode were collected from different potato fields in Bahar regions. Species identification was based on the morphological and morphometric characters of second stage juveniles and cysts, and by using species-specific primers and nucleotide sequences of the D2-D3 expansion segments of the 28S rRNA gene. Four potato cultivars viz Désirée, Marfona, Sante and Agria were used for pathotype determination, in pot experiments. The plants were treated by 6 ± 1 eggs and second stage juveniles and maintained in growth chambers at 18-22°C for three months. Based on the results of resistance assessment and relative susceptibility of the tested cultivars the pathotype of the populations was determined as Ro1. The obtained sequences were compared through BLAST search from the NCBI and the phylogenic tree was depicted. The impact of susceptible cultivars Marfona, Désirée, resistant cultivars sante, and Agria on egg hatching indicated that there is no significant difference among the cultivars in most pot experiments and all the cultivars were placed in the same statistical groups.

Keywords: Hamadan, potato, *Globodera rostochiensis* 28S rDNA

* Part of M.Sc. Thesis of The First Author, Submitted to Faculty of Agriculture, Zanzan University, Zanzan, Iran.

** Corresponding author's E-mail: tanhamaafi@iripp.ir, zahrata.maafi@yahoo.com

1. Former M.Sc. student and Assistant Professor of Plant Pathology, respectively, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Zanzan University, Zanzan, Iran.
2. Associate Professor of Nematology Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
3. Research Instructor, Plant Protection Research Department, Hamedan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Hamedan, Iran.

مقدمه

سیستی سیب‌زمینی در پرو ۱۳/۲ تا ۵۸ درصد، جمهوری چک ۲۰ تا ۷۰ درصد، نیویورک ۷۹ درصد، در پاناما ۵۰ درصد گزارش شده است (Brodie & Mai 1989). نماتدهای سیستی سیب‌زمینی دارای تعدادی زیادی پاتوتیپ هستند. برای گونه *G. rostochiensis* پنج پاتوتیپ شامل (Ro1-Ro5) و سه پاتوتیپ برای *G. pallida* شامل (Pa1, Pa2, Pa3) شناخته شده است (Kort et al. 1977). مهمترین پاتوتیپ *G. rostochiensis*، پاتوتیپ شماره یک (Ro1) است که مقاومت به این پاتوتیپ در چندین گونه از سیب‌زمینی شناخته شده است (Ellenby 1954). برای کاشت واریته مقاوم در مزرعه شناسایی پاتوتیپ نماتد سیستی سیب‌زمینی فاکتور کلیدی است (Douda et al. 2010).

هدف از انجام این تحقیق تعیین پاتوتیپ گونه *G. rostochiensis* در تعدادی از مزارع آلوده سیب‌زمینی شهرستان بهار همدان، تعیین خصوصیات مولکولی جمعیت‌ها و تأثیر آنها روی میزان تفریح تخم از سیست‌ها بود.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی

جهت تهیه جمعیت‌های مختلف نماتد سیستی سیب‌زمینی بعد از پایان فصل زراعی در سال ۱۳۹۱، تعداد ۱۰ نمونه خاک از مزارع سیب‌زمینی آلوده واقع در منطقه بهار استان همدان جمع‌آوری شد (جدول ۱). خاک‌های جمع‌آوری شده در شرایط آزمایشگاه خشک شدند، سپس سیست‌های موجود در نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فنوتیک استخراج شدند (Fenwick 1949). تعدادی از سیست‌های هر نمونه خاک برای شناسایی مرفولوژیکی و مولکولی

نماتدها از عوامل بیماری‌زای گیاهی هستند که به طور متوسط باعث کاهش ۱۰ درصد کل محصول می‌شوند و ارزش اقتصادی خسارت ناشی از آن‌ها بالغ بر یک‌صد میلیارد دلار برآورد شده است (Sasser 1989). بر اساس آمار FAO سیب‌زمینی بعد از گندم، برنج و ذرت با سطح کشتی معادل ۱۹۴۶۳۰۴۱ هکتار چهارمین محصول زراعی دنیا است و میزان تولید آن ۳۶۸۰۹۶۳۶۲ تن برآورد شده است (FAOSTAT 2013). بیشترین خسارت نماتدها در مناطقی ایجاد می‌شود که میزبان مناسب آن‌ها به طور متناوب و برای چندین سال متوالی در یک مزرعه کشت گردد (Sasser & Freckman 1987). گونه *Globodera rostochiensis* که به اسامی نماتد سیستی طلائی سیب‌زمینی، نماتد سیستی زرد سیب‌زمینی و نماتد طلائی معروف است، به عنوان مخرب‌ترین و خسارت‌زاترین بیمارگر محصول سیب‌زمینی در دنیا محسوب می‌گردد، می‌تواند تا ۱۰۰ درصد باعث خسارت شود و از مناطق سیب‌زمینی کاری ۶۵ کشور دنیا گزارش شده است (Brodie 1984). مبدا اصلی نماتدهای سیستی سیب‌زمینی کوه‌های آند واقع در آمریکای جنوبی است (Evans et al. 1975; Canto-Saenz & De Scurrah, 1977). اگرچه این نماتد از بسیاری از مناطق دنیا گزارش شده است ولی سازمان حفاظت نباتات اروپا و مدیترانه (EPPO) این گونه را جزء یکی از آفات قرنطینه‌ای گروه A2 در بسیاری از کشورهای این منطقه قرار داده است (OEPP/EPPO 2004). نماتد سیستی طلائی سیب‌زمینی *G. rostochiensis* برای اولین بار از ایران در سال ۱۳۸۷ و از استان همدان گزارش شد (Gitty & Tanha Maafi 2008). کاهش محصول سیب‌زمینی در اثر آلودگی مزارع به نماتد

جدول ۱. مشخصات جمعیت‌های مورد مطالعه نماتد سیبسی *Globodera rostochiensis* در مزارع سیب‌زمینی رقم مارفونا شهرستان بهار و متوسط تخم و لارو در سیست

Table 1. Characteristics of the cyst nematode, *Globodera rostochiensis* in farms of potato cv. Marfona of Bahar County and the mean of eggs and second stage juveniles per cyst.

Population	Mean number of eggs and J2s/cyst	Field area (Ha)	Locality	Latitude	Longitude
Ham-Gan 1	105	14	Ganjtpeh	34; 56; 663	48; 29; 638
Ham-Gan 2	150	5	Ganjtpeh	-	48; 29; 638
Ham-Gan 3	33	9	Ganjtpeh	34; 56; 611	48; 29; 638
Ham-Yek 4	113	5	Yekenabad	34; 54; 029	48; 28; 19.9
Ham-Gan 5	76	10	Ganjtpeh	-	-
Ham-Har 6	106	2	Haroonabad	34; 56; 19.8	48; 26; 02.6
Ham-Yek 7	86	4	Yekenabad	34; 54; 04.0	48; 28; 26.0
Ham-Yek 8	140	5	Yekenabad	34; 45; 05.8	48; 28; 34.7
Ham-Yek 9	65	5	Yekenabad	-	-
Ham-Ans 10	69	5	Ansarolemam	34; 52; 473	48; 29; 410

جدول ۲. ترادف نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در تعیین گونه نماتدهای سیبسی سبب‌زمینی.

Table 2. Nucleotide sequences of primers used for identification of potato cyst nematodes species.

Species & primers	Forward primer	Reverse Primer
<i>G. rostochiensis</i> , Ro	5'-GCAAGCCCAGCGTCAGCAAC-3'	5'-GAACATCAACCTCCTATCGG-3'
<i>G. pallida</i> , Pa	5'-TGTCCATTCTCTCCACCAG-3'	5'-CCGCTTCCCCATTGCTTTTCG-3'
<i>G. rostochiensis</i> , D2A, D3B	5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3'	5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'

پلی‌مرز تعیین توالی گردید و ترادف‌های نوکلئوتیدی حاصل با استفاده از برنامه نرم افزار Clustal X هم‌ردیف‌سازی شد. این ترادف‌ها با استفاده از برنامه BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) با ترادف نوکلئوتیدی جدایه‌های موجود در GenBank مقایسه شدند (جدول ۳) و با رِس شماره‌های KU297654 - KU297661 در این پایگاه جهانی ذخیره گردیدند. درصد شباهت آنها تعیین و درخت فیلوژنتیکی مربوطه به روش Maximum Parsimony با استفاده از نرم افزارهای P.A.U.P.* نسخه 4.0b10 رسم شد.

تعیین میزان آلودگی و جمعیت تخم و لارو درون سیست

برآورد و تعیین جمعیت تخم و لارو درون هر سیست، در تعداد ۱۰ سیست با اندازه‌های مختلف ولی به نسبت

مورد استفاده قرار گرفتند. شناسایی بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی سیست‌ها و لاروهای سن دوم و با استفاده از منابع علمی معتبر انجام شد (Wouts & Baldwin 1998, OEPP/EPPO 2004)

برای شناسایی مولکولی، سیست‌ها خرد و استخراج دی‌ان‌ای از تخم و لاروهای داخل آنها صورت گرفت (Tanha Maafi et al. 2003)، بخشی از دی‌ان‌ای استخراج شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه‌های *G. rostochiensis* و *G. pallida* به شرح جدول ۲ بررسی شد (Fullaondo et al. 1999).

تکثیر ناحیه D2-D3 از ژن RNA زیرواحد بزرگ ریوزومی نیز با آغازگرهای رفت و برگشت D2A و D3B (جدول ۲) از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای هشت جمعیت نماتد سیبسی سبب‌زمینی انجام گردید (Subbotin et al. 2006). محصول واکنش زنجیره‌ای

جدول ۳. گونه‌ها و جمعیت‌های نماتدهای سیب‌زمینی مورد استفاده در درخت تبارزایی.

Table 3. Species and populations of potato cyst nematodes used in phylogenetic tree.

Species	Locality	Pathotype	Accession number	Reference
<i>Globodera rostochiensis</i>	Hamadan, Iran	Ro1	KU297654	Present Study
<i>G. rostochiensis</i>	Hamadan, Iran	Ro1	KU297655	Present Study
<i>G. rostochiensis</i>	Hamadan, Iran	Ro1	KU297656	Present Study
<i>G. rostochiensis</i>	Hamadan, Iran	Ro1	KU297657	Present Study
<i>G. rostochiensis</i>	Hamadan, Iran	Ro1	KU297658	Present Study
<i>G. rostochiensis</i>	Hamadan, Iran	Ro1	KU297659	Present Study
<i>G. rostochiensis</i>	Hamadan, Iran	Ro1	KU297660	Present Study
<i>G. rostochiensis</i>	Hamadan, Iran	Ro1	KU297661	Present Study
<i>G. rostochiensis</i>	Šluknov (Czech Republic)	Ro1	GU338015	Douda <i>et al.</i> , 2010
<i>G. rostochiensis</i>	Obersteinbach (Germany)	Ro3	GU338016	Douda <i>et al.</i> , 2010
<i>G. rostochiensis</i>	Harmerz Germany (SPA)	Ro5	GU338017	Douda <i>et al.</i> , 2010
<i>G. pallida</i>	UK	Pa1	GU338018	Douda <i>et al.</i> , 2010
<i>G. pallida</i>	Aveest (Netherlands)	Pa2	GU338019	Douda <i>et al.</i> , 2010
<i>G. pallida</i>	Kalle (France)	Pa2	GU338020	Douda <i>et al.</i> , 2010
<i>G. pallida</i>	Delmsen (Germany)	Pa3	GU338021	Douda <i>et al.</i> , 2010
<i>G. pallida</i>	Kašperske Hory (Czech Republic)	unknown	GU338022	Douda <i>et al.</i> , 2010
<i>G. rostochiensis</i>	Canada, Québec, Saint Amable, sample 2	-	GQ294484	Madani <i>et al.</i> , 2010
<i>G. rostochiensis</i>	Canada, Québec, Saint Hyacinth, sample 1	-	GQ294486	Madani <i>et al.</i> , 2010
<i>G. rostochiensis</i>	Canada, Québec, Saint Hyacinthe, sample 2	-	GQ294487	Madani <i>et al.</i> , 2010
<i>G. rostochiensis</i>	Canada, Newfoundland, Avondale, sample 1	-	GQ294488	Madani <i>et al.</i> , 2010
<i>G. pallida</i>	Canada, Newfoundland, Avondale, sample 1	-	GQ294489	Madani <i>et al.</i> , 2010
<i>G. pallida</i>	Canada, Newfoundland, Avondale, sample 2	-	GQ294490	Madani <i>et al.</i> , 2010
<i>G. pallida</i>	Canada, Newfoundland, Avondale, sample 3	-	GQ294491	Madani <i>et al.</i> , 2010
Outgroup taxa				
<i>G. tabacum</i>	USA, Connecticut	-	GQ294492	Madani <i>et al.</i> , 2010
<i>Heterodera glycines</i>	USA	-	JQ067684	

لارو در سیست محاسبه شد.

آزمایش تعیین پاتوتیپ در جمعیت‌های نماتد سیب‌زمینی

بذر ارقام مورد آزمایش شامل دزیره (Désirée)، مارفونا (Marfona)، اگریا (Agria) و سانته (Sante) از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی همدان تهیه گردید. برای دو جمعیت هفت و نه از هر چهار رقم استفاده شد، ولی به دلیل محدودیت در مقدار بذر در تعدادی از جمعیت‌ها از رقم حساس مارفونا و در تعدادی دیگر از رقم حساس دزیره استفاده شد. خاک آزمایشی دارای نسبت مساوی از رس، خاک برگ کاملاً پوسیده و ماسه

یکسان انجام شد. به منظور برآورد دقیق تخم و لارو موجود در هر سیست، از جمعیت‌های ۲، ۶، ۷، ۸ و ۱۰ که تراکم جمعیت بالایی داشتند، تعداد ۲۰ بسته ۱۰ تایی سیست و از جمعیت ۹ تعداد ۱۰ بسته ۱۰ عددی سیست و از چهار جمعیت دیگر سه بسته ۱۰ عددی سیست انتخاب و میانگین تعداد تخم و لارو محاسبه شد (جدول ۱). سیست‌های هر بسته ۱۰ عددی توسط سیست خردکن شیشه‌ای در یک میلی‌لیتر آب، خرد شده و سوسپانسیون تخم و لارو به دست آمده به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانیده شد. یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون در زیر استرنومیکروسکوپ شمارش شد. شمارش تخم و لارو سه بار تکرار شد و میانگین جمعیت تعیین و تعداد تخم و

بشر منتقل گردید. سوسپانسیون به دست آمده در زیر استرئومیکروسکوپ بررسی شد و تعداد سیست‌های حاصله جداسازی و شمارش شدند. برای استخراج سیست‌های احتمالی آزاد (رها) شده در خاک، خاک مربوط به هر گلدان را مخلوط کرده، ابتدا در دمای اتاق نگهداری شد تا رطوبت خود را از دست دهد، سپس به منظور رطوبت‌گیری نهایی ۳۰۰ گرم از آن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آن خشک گردید. ۱۰۰ گرم آن با استفاده از دستگاه فنریک (Fenwick) بررسی گردید. سیست‌های به دست آمده در زیر استرئومیکروسکوپ شمارش شدند. مجموع سیست‌های حاصله از خاک و ریشه به عنوان جمعیت نهایی در نظر گرفته شد. برای محاسبه درصد حساسیت نسبی ارقام مورد آزمایش، طبق فرمول "جمعیت نهایی نماتد روی رقم مقاوم / جمعیت نهایی روی رقم حساس × ۱۰۰" عمل شد. همچنین فاکتور تولیدمثل (Reproduction factor) تعداد ده جمعیت روی ارقام مورد آزمایش بر مبنای نسبت تعداد سیست تشکیل شده (جمعیت نهایی سیست Pf) بر تعداد سیست‌های اولیه (جمعیت اولیه سیست Pi) محاسبه گردید و برآورد درجه مقاومت ارقام مورد آزمایش نسبت به نماتد سیستی سیب‌زمینی بر اساس پروتکل صورت پذیرفت (Anonymous 2007) (جدول ۴). سپس با مقایسه درصد حساسیت نسبی و درجه مقاومت ارقام سیب‌زمینی مورد آزمایش نسبت به نماتد سیستی، پاتوتیپ نماتد *G. rostochiensis* در منطقه بهار همدان تعیین گردید.

بررسی تأثیر ارقام سیب‌زمینی بر تفریح سیست‌های *G. rostochiensis*

جهت بررسی تأثیر ترشحات ریشه ارقام مقاوم و حساس سیب‌زمینی بر میزان تفریح لارو نماتد سیستی

بود که در دستگاه ضد عفونی کننده خاک با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت پاستوریزه شد. برای اطمینان از عدم حضور سیست در خاک ضد عفونی شده، چهار نمونه ۱۰۰ گرمی به طور تصادفی از خاک پاستوریزه برداشته شد و با استفاده از روش فنریک بررسی شد. جهت آزمون بیماری‌زایی از گلدان‌هایی با حجم ۵۰۰ و ۱۰۰۰ سانتی‌متر مکعب استفاده شد. دو سوم حجم گلدان‌ها با خاک پاستوریزه پر شدند، سپس میزان جمعیت اولیه به ازای 1 ± 6 تخم و لارو در گرم خاک به صورت سیست که در توری‌هایی با قطر کمتر از ۰/۲ میلی‌متر قرار داده شده بودند، به خاک اضافه شد. تعداد سیست بر اساس میانگین تخم و لارو موجود در آنها برای هر جمعیت انتخاب شد. غده‌های سیب‌زمینی جوانه‌دار شده روی توری‌های حاوی نماتد در عمقی معادل دو تا سه برابر قطرشان کاشته شدند و بعد از کاشت آبیاری مختصری صورت گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. گلدان‌ها در اتاقک رشد با شرایط حرارت ثابت با دمای ۱۸ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت سه ماه نگهداری شدند. گلدان‌ها در طول مدت آزمایش با آب معمولی آبیاری شدند.

برداشت گیاهان و بررسی شاخص‌های تکثیر

پس از گذشت ۹۰ روز از شروع آزمایش هر یک از گیاهان از خاک خارج شدند. ابتدا اندام‌های هوایی گیاهان قطع شد و پس از خارج کردن ریشه‌ها از گلدان‌ها، ریشه‌ها با فشار آب روی الک ۵۰۰ میکرومتر که روی الک ۱۵۰ میکرومتر قرار داده شده بود، شسته شدند تا ماده‌ها و سیست‌های تشکیل شده روی ریشه، از آن‌ها جدا شوند. محتوای سطح الک ۱۵۰ میکرومتر پس از شستشو به داخل

موجود (Wouts & Baldwin 1998, OEPP/EPPO 2004) تمامی جمعیت‌های بررسی شده، گونه *Globodera rostochiensis* Wollenweber, 1923 تشخیص داده شدند. ماده‌های جوان این گونه در ابتدای تشکیل، سفید مایل به شیری بوده، سپس زرد رنگ شده و بعد از مدتی تبدیل به سیست‌های طلائی تا قهوه‌ای می‌شوند. سیست‌ها گرد و بدون برجستگی مخروطی در انتهای بدن هستند. در سیست‌ها گسیختگی و تخریب غشای کوتیکولی ناحیه اطراف شکاف تناسلی تشکیل پنجره‌ای دایره‌ای شکل (Circumfenestrate) داده است که از مشخصات جنس *Globodera* است (شکل (C-E)).

برخی ویژگی‌های ریخت سنجی ناحیه انتهایی سیست در *G. rostochiensis* به شرح ذیل است:

Distance from anus to the vulval basin = 52 ± 8.6 (42-68), Vulval basin diameter = 15.9 ± 1.45 (14-19), Granek's ratio = 3.16 ± 0.3 (1.5-4.4).

لارو سن دوم کرمی شکل، دارای مشخصات عمومی لارو سن دوم زیر خانواده Heteroderinae شبکه کوتیکولی سر قوی و رشد یافته، استایلت قوی و دارای گره‌های گرد، کوتیکول دارای حلقه‌های عرضی مشخص و چهار خط طولی در سطح جانبی است. حباب میانی مری گرد تا بیضوی، دارای دریچه مشخص در وسط، غدد مری از سمت شکم روی ابتدای روده را می‌پوشانند. دم مخروطی که به انتهای گرد ظریفی منتهی می‌شود، ناحیه شفاف انتهایی (هیالین) تقریباً نصف طول دم است (شکل (A, B-1)). مشخصات ریخت سنجی لارو سن دوم در پنج جمعیت آزمایش شده برای تعیین پاتوتیپ در جدول ۵ نشان داده شده است.

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگر اختصاصی تشخیص بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی را تایید کرد. تمامی جمعیت‌های بررسی شده با آغازگر

جدول ۴. درجه مقاومت و حساسیت نسبی ارقام سیب‌زمینی به نماتد سیستی *Globodera rostochiensis* (Anonymous 2007)

Table 4. Resistance level and relative susceptibility of potato cultivars to potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis* (Anonymous 2007).

Relative susceptibility (%)	Score*
1 <	9
1.1-3	8
3.1-5	7
5.1-10	6
10.1-15	5
15.1-25	4
25.1-50	3
50.1-100	2
100 >	1

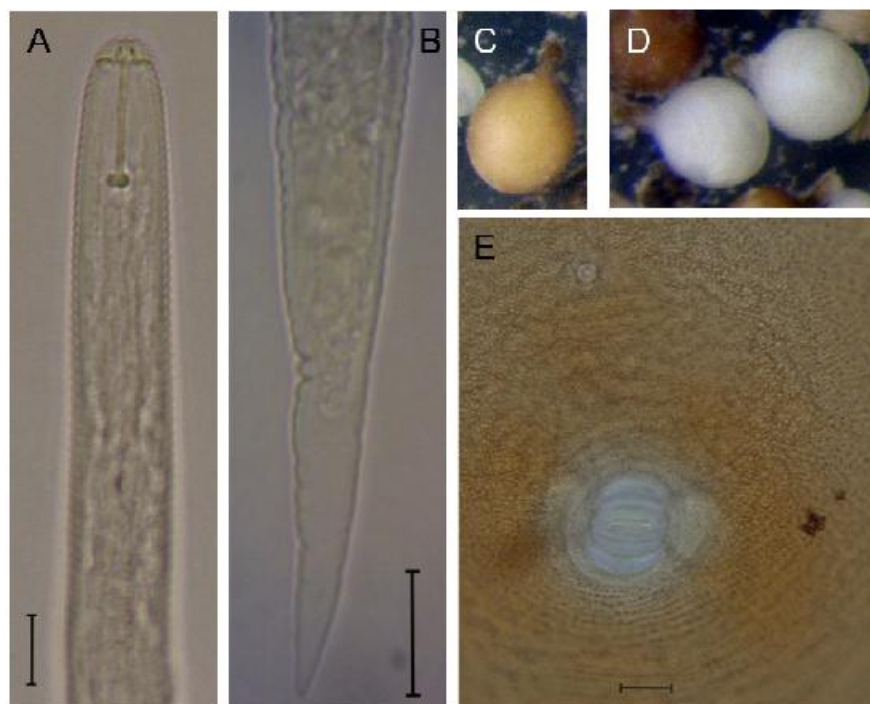
*The scores from one to nine indicate the lowest and highest level of resistance respectively.

سیب‌زمینی *G. rostochiensis* پس از اتمام آزمایش، سیست‌های داخل توری که به عنوان جمعیت اولیه در هر واحد آزمایشی استفاده شده بودند، خرد و تعداد تخم و لاروهای تفریح نشده و باقیمانده در آن‌ها شمارش شد، با تفاضل عدد به دست آمده از جمعیت اولیه، تعداد لاروهای خارج شده یا به عبارتی تعداد تخم‌های تفریح شده از سیست‌ها به دست آمد. به منظور بررسی تأثیر هر یک از ارقام حساس و مقاوم بر میزان و تعداد لاروهای تفریح شده از سیست و بررسی احتمالی وجود اختلاف بین آن‌ها، داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه آماری شدند و با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن گروه‌بندی میانگین‌ها انجام شد.

نتایج

شناسایی

با بررسی مشخصات ریخت‌شناسی و ریخت سنجی سیست‌ها و لاروهای سن دوم و مقایسه آن‌ها با منابع



شکل ۱. *Globodera rostochiensis*. A و B: به ترتیب ابتدای بدن و دم لارو سن دوم؛ C و D: به ترتیب سیست و ماده جوان؛ E: مخرج و پنجره‌بندی در انتهای سیست (شاخص معادل ۱۰ میکرومتر).

Fig 1. *Globodera rostochiensis*. A & B: Anterior end and tail of second stage juvenile; C & D: Cyst and young female; E: Anus and vulval fenestration (Scale bar: 10 μ m).

واکنش ارقام آزمایشی نسبت به جمعیت‌های نماتد سیسنی سیب‌زمینی

ارقام مارفونا و دزیره واکنش کاملاً حساس به تمامی ده جمعیت *G. rostochiensis* نشان دادند و فاکتور تولیدمثل در آنها از حداقل ۲/۴۶ تا ۳۴/۹۵ بود. ارقام آگریا و سانته نسبت به جمعیت‌ها مقاوم و تکثیری روی این ارقام صورت نگرفت. فاکتور تولیدمثل *Globodera rostochiensis* و حساسیت نسبی و درجه مقاومت ارقام در جدول ۶ نشان داده شده است.

تأثیر ارقام مقاوم و حساس بر میزان تفریح تخم *G. rostochiensis*

در تعداد شش جمعیت که با رقم حساس مارفونا و ارقام مقاوم آگریا و سانته آزمایش شدند، از نظر آماری بین

اختصاصی گونه *G. rostochiensis* واکنش مثبت نشان داده و قطعه‌ای به طول حدود ۳۱۵ کیلو باز ایجاد کردند (شکل ۲)، در حالی که با آغازگر اختصاصی *G. pallida* تکثیری صورت نگرفت و هیچ بانندی تشکیل نشد. در صورت مثبت شدن واکنش با این آغازگر، انتظار می‌رفت قطعه‌ای بطول حدود ۷۹۸ کیلو باز تشکیل شود (Fullaondo et al. 1999).

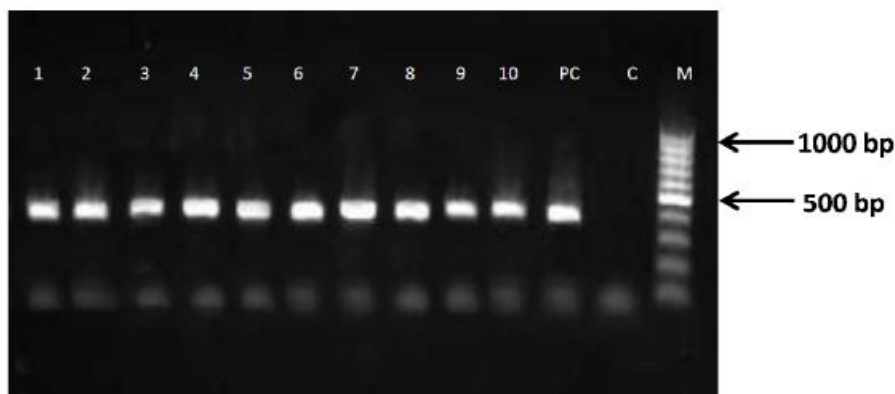
میزان جمعیت تخم و لارو موجود در سیست

میانگین تعداد تخم و لارو در هر سیست همراه با مشخصات جمعیت‌ها در جدول ۱ ذکر شده است. میانگین تعداد تخم و لارو موجود در یک سیست از حداقل ۳۳ عدد تخم و لارو تا حداکثر ۱۴۰ عدد در ده جمعیت جمع‌آوری شده متغیر بود.

جدول ۵. خصوصیات ریخت‌سنجی لارو سن دوم *Globodera rostochiensis* در پنج جمعیت جمع‌آوری شده از مزارع سیب‌زمینی استان همدان (اندازه‌ها به میکرومتر).

Table 5. Morphometric characters of second stage juveniles of *Globodera rostochiensis* from five populations collected from Hamadan province (All measurements in micrometer).

Characters	population 1	population 3	population 5	population 6	population 9
n	7	7	9	9	9
L	370 ± 13.7 (379-411)	390 ± 22 (357-418)	419 ± 20.7 (368-439)	425 ± 30.1 (383-475)	411 ± 17.7 (383-438)
a	19.4 ± 9.8 (21.1-18.7)	19.9 ± 17.3 (19.8-19.9)	20.6 ± 6.8 (20.4-15.7)	24.1 ± 42.6 (22.5-25.0)	22.4 ± 13.6 (22.5-20.9)
b	2.6 ± 0.6 (2.3-2.8)	2.8 ± 0 (2.5-3.0)	3.5 ± 2.4 (3.3-3.4)	3. ± 3.3 (3.1-3.1)	3.0 ± 3.4 (3.0-3.0)
c	8.3 ± 5.0 (9.0-8.2)	8.7 ± 3.19 (11.9-8.2)	8.9 ± 6.5 (8.8-9.2)	8.8 ± 10.6 (8.5-9.0)	8.5 ± 5.4 (9.1-8.1)
c'	4.0 ± 1.6 (3.6-4.2)	4.18 ± 0.16 (4.09-4.54)	4.27 ± 0.2 (4.12-4.45)	4.30 ± 0.9 (4.15-4.60)	4.50 ± 0.6 (4.2-4.62)
Stylet	20.9 ± 1.1 (20-22)	21.3 ± 0.8 (20-22)	21.3 ± 0.5 (21-22)	20.8 ± 0.7 (20-22)	21.1 ± 0.8 (20-22)
Lip region height	3.6 ± 0.8 (3-5)	4.0	3.6 ± 0.5 (3-4)	3.7 ± 0.5 (3-4)	4.1 ± 0.3 (4-5)
Lip region width	9.6 ± 0.8 (9-11)	9.6 ± 0.8 (9-11)	9.0 ± 0.5 (8-10)	9.0 ± 0.5 (8-13)	9.2 ± 0.4 (9-10)
DGO	8.6 ± 1.7 (5-10)	7.7 ± 0.8 (7-9)	8.0 ± 0.9 (7-9)	6.4 ± 0.9 (5-8)	7.6 ± 0.5 (7-8)
Anterior end to excretory pore	86.3 ± 12.8 (72-103)	88.5 ± 13.3 (65-100)	90.4 ± 7.1 (76-100)	88.3 ± 8.8 (79-107)	76.8 ± 11.3 (68-100)
Anterior end to median bulb	66.6 ± 4.49 (61-74)	67.3 ± 6.5 (60-73)	58.7 ± 5.7 (52-66)	60.2 ± 5.5 (54-69)	58.78.0 (50-70)
Maximum body width	20.4 ± 1.4 (18-22)	19.6 ± 1.3 (18-21)	20.3 ± 3.0 (18-28)	17.7 ± 0.7 (17-19)	18.2 ± 1.3 (17-21)
Anal body width	12.0 ± 1.7 (10-14)	11.9 ± 2.0 (10-16)	10.9 ± 0.9 (10-12)	10.9 ± 0.6 (10-12)	14.8 ± 4.7 (11-21)
Hyaline part of tail	24.0 ± 2.4 (21-28)	24.2 ± 1.5 (22-26)	22.9 ± 2.5 (20-26)	22.4 ± 2.1 (19-26)	22.8 ± 1.3 (22-26)
Tail	47.6 ± 2.8 (42-50)	44.9 ± 7.2 (30-51)	46.9 ± 3.2 (40-50)	48.6 ± 2.8 (45-53)	48.6 ± 3.2 (42-54)
Hyaline/Stylet	1.2 ± 2.3 (1.1-1.3)	1.1 ± 2.0 (1.1-1.2)	1.1 ± 4.9 (1.0-1.2)	1.1 ± 3.2 (1.0-1.2)	1.1 ± 1.7 (1.1-1.2)
Anterior end to genital primordium	239 ± 8.7 (229-250)	248 ± 10.2 (238-258)	253 ± 12.6 (230-266)	257 ± 27.1 (216-290)	243 ± 7.8 (230-249)



شکل ۲. محصول تکثیر قطعه ۳۱۵ جفت بازی با استفاده از پرایمر اختصاصی گونه *Globodera rostochiensis* 1-10: ده جمعیت نامند سیستمی سبزمینی، PC کنترل مثبت، C: کنترل منفی، M: مارکر DNA ۱۰۰ جفت بازی.

Fig 2. Amplification products fragment of 315 base pairs using species specific primer of *Globodera rostochiensis*. 1-10: ten populations of potato cyst nematode, PC: Positive control, C: negative control, L: DNA marker 100 bp.

و سائته برد، از نظر آماری تفاوتی در تعداد لارو خارج شده از سیست بین هر یک از این ارقام و جمعیت‌ها وجود نداشت و هر چهار رقم و هر دو جمعیت بررسی شده در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۹).

تکثیر ناحیه D2-D3-rDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

تکثیر ناحیه D2-D3 از ژن زیر واحد بزرگ ریبوزومی RNA در ۱۰ جمعیت مورد بررسی تولید یک قطعه به طول تقریبی ۷۵۰ جفت باز بود، بجز قطعه تولید شده، هیچ‌گونه باند اضافی در هیچ یک از جمعیت‌ها مشاهده نشد (شکل ۳). ترادف‌های نوکلئوتیدی این ناحیه از ۶۹۶ تا ۷۶۵ جفت باز متغیر بود. تعداد هشت ترادف جدید به دست آمده از جمعیت‌های مورد آزمایش با ترادف‌هایی از جمعیت *G. rostochiensis* ذخیره شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI (جدول ۲)، با استفاده از برنامه بلاست مقایسه شدند، تمامی جمعیت‌ها تشابه ۹۹ تا ۱۰۰ درصد را با ترادف‌های ذخیره شده گونه *G. rostochiensis* نشان دادند. ترادف نوکلئوتیدی جمعیت‌های بررسی شده یکسان

ارقام تفاوت معنی‌داری از نظر میزان تفریح تخم و خروج لارو سن دوم در این شش جمعیت مشاهده نشد و هر سه رقم در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۷). ولی بین جمعیت‌ها تفاوت‌هایی در تعداد لاروهای خارج شده از سیست وجود داشت، به طوری که جمعیت ۲ و ۴ به ترتیب با میانگین ۲۹۹۸ و ۲۷۲۵ بیشترین خروج لارو از سیست را داشتند، پس از آن جمعیت‌های ۵، ۷ و ۹ در گروه بعدی و جمعیت ۳ با کمترین میزان تفریح ۱۲۹۴ عدد لارو در آخرین گروه قرار گرفت (جدول ۷).

در آزمایش‌هایی که رقم حساس دزیره به عنوان رقم حساس با دو رقم مقاوم آگریا و سائته با شش جمعیت بررسی شدند، این رقم با رقم سائته از نظر تعداد لاروهای تفریح شده تفاوت معنی‌داری نشان داد ولی رقم آگریا بین این دو گروه آماری قرار گرفت (جدول ۸). از نظر عکس‌العمل جمعیت‌ها نیز جمعیت ۶ و ۱ با بیشترین میزان تفریح در گروه جداگانه‌ای از جمعیت‌های ۷، ۸، ۱۰ و ۹ قرار گرفتند (جدول ۸).

در آزمایش انجام شده با دو جمعیت ۷ و ۹ که شامل هر دو گیاه حساس مارفونا و دزیره و دو رقم مقاوم آگریا

جدول ۶. میانگین فاکتور تولدمثل *Globodera rostochiensis* در ارقام آزمایش شده سبب‌زمینی و حساسیت نسبی و درجه مقاومت آنها.

Table 6. Mean of reproduction factor of *Globodera rostochiensis* on tested potato cultivars and their relative susceptibility and resistance level.

Population	Cultivar	Mean Number of cysts	Reproduction factor	Relative susceptibility %	Resistance level
Ham-Gan 1	Désirée	959	16.53	100	2
	Agria	3	0.05	0.3	9
	Sante	0	0.01	0.1	9
Ham-Gan 2	Marfona	1224	8.16	100	2
	Agria	6	0.04	0.4	9
	Sante	0	0.006	0.08	9
Ham-Gan 3	Marfona	522	2.46	100	2
	Agria	1	0.004	0.19	9
	Sante	0	0.00	0.00	9
Ham-Yek 4	Désirée	155	2.50	100	2
	Agria	0	0.01	0.64	9
	Sante	0	0.00	0.00	9
Ham-Gan 5	Marfona	642	9.17	100	2
	Agria	6	0.08	0.9	9
	Sante	0	0.01	0.15	9
Ham-Har 6	Désirée	707	12.40	100	2
	Agria	0	0.01	0.14	9
	Sante	0	0.00	0.00	9
Ham-Yek 7	Marfona	560	16.00	100	2
	Désirée	242	6.91	100	2
	Agria	0	0.02	0.17	9
	Sante	0	0.00	0	9
Ham-Yek 8	Désirée	769	34.95	100	2
	Agria	0	0.04	0.13	9
	Sante	0	0.00	0.00	9
Ham-Yek 9	Marfona	801	17.04	100	2
	Désirée	192	4.08	100	2
	Agria	0	0.02	0.12	9
	Sante	0	0.00	0.00	9
Ham-Ans 10	Désirée	493	11.20	100	2
	Agria	0	0.02	0.2	9
	Sante	0	0.00	0.00	9

ترادف نوکلئوتیدی و آنالیز فیلوژنتیکی

درخت تبارزایی با توالی‌های ناحیه D2-D3 ژن زیر واحد بزرگ ریبوزومی rDNA هشت جمعیت *G. rostochiensis* جمع‌آوری شده از منطقه بهار همدان و ۱۵ جمعیت از *G. pallida*، *G. rostochiensis* و *G. tabacum*

و تفاوتی را در طول قطعه نشان ندادند. تشابه ترادف‌های جمعیت ایران با یکدیگر ۱۰۰ درصد و با دیگر جمعیت‌های *G. rostochiensis* ذخیره شده در بانک جهانی ژن، ۹۹ تا ۱۰۰ درصد بود.

ذخیره شده در بانک ژن جهانی با روش Maximum Parsimony ترسیم شد (شکل ۴).

تعداد هشت جمعیت *G. rostochiensis* ایران که در آزمایش‌های تعیین پاتوتیپ Ro1 شناسایی شده بودند با پاتوتیپ Ro1 کشور چک قرابت نزدیکی نشان دادند، ولی پاتوتیپ‌های Ro3 و Ro5 گونه *G. rostochiensis* و Pa1 و Pa2 و Pa3 گونه *G. pallida* متعلق به کشور چک و جمعیت‌هایی از *G. rostochiensis* و *G. pallida* با پاتوتیپ نامشخص از کشور کانادا شامل رس شماره‌های GQ294489، GQ294488، GQ294487، GQ294484 کلید جداگانه‌ای قرار گرفتند. گونه *G. tabacum* همراه با گونه *Heterodera glycines* که به عنوان خارج از گروه (outgroup) تعریف شده بود در یک گروه قرار گرفتند. درخت تبارزایی به دست آمده تفاوت گونه *G. rostochiensis* ایران را با گونه *G. pallida* و گونه دیگر *G. tabacum* را نشان داد و قرابت پاتوتیپ Ro1 شناسایی شده با پاتوتیپ Ro1 موجود در بانک ژن جهانی نیز به وضوح نشان داده شد.

بحث

تمامی ده جمعیت نماتد سیستی سبب‌زمینی *G. rostochiensis* جمع‌آوری شده از شهرستان بهار استان همدان، قادر به آلوده کردن رقم مارفونا که نسبت به پاتوتیپ شماره یک (*G. rostochiensis* (Ro1) کاملاً حساس است و همچنین رقم دزیره که نسبت به تمامی پاتوتیپ‌های *G. rostochiensis* حساس است، بودند. در حالی که هیچ‌یک از این جمعیت‌ها نتوانستند روی ارقام سانه و آگریا که نسبت به پاتوتیپ شماره یک (*G. rostochiensis* (Ro1) مقاوم هستند، آلودگی ایجاد نمایند. با توجه

جدول ۷. میانگین تفریح تخم شش جمعیت نماتد سیستی سبب‌زمینی در ارقام سبب‌زمینی مارفونا، آگریا و سانه

Table 7. Mean comparison of hatched egg of potato cyst nematode from six field populations in potato cultivars Marfona, Agria and Sante

Population	Hatched eggs/cysts*	Cultivar	Hatched eggs/cysts*
Ham-Gan 2	2998 a	Marfona	2150 a
Ham-Yek 4	2725 a	Agria	1998 a
Ham-Gan 5	2013 b	Sante	1892 a
Ham-Yek 7	1528 bc		
Ham-Yek 9	1524 bc		
Ham-Gan 3	1294 c		

* Numbers with the same letters are not significantly different in each column according to Duncan's Multiple Range Test.

جدول ۸. میانگین تفریح تخم شش جمعیت نماتد سیستی سبب‌زمینی در ارقام سبب‌زمینی دزیره، آگریا و سانه

Table 8. Mean comparison of egg hatched of potato cyst nematode of six field populations in potato cultivars Désirée, Agria and Sante.

Population	Hatched eggs/cysts*	Cultivar	Hatched eggs/cysts*
Ham-Har 6	4348 a	Sante	2768 a
Ham-Gan 1	3935 a	Agria	2442 ab
Ham-Yek 7	1843 b	Désirée	2246 b
Ham-Yek 8	1796 b		
Ham-Ans 10	1726 b		
Ham-Yek 9	1263 b		

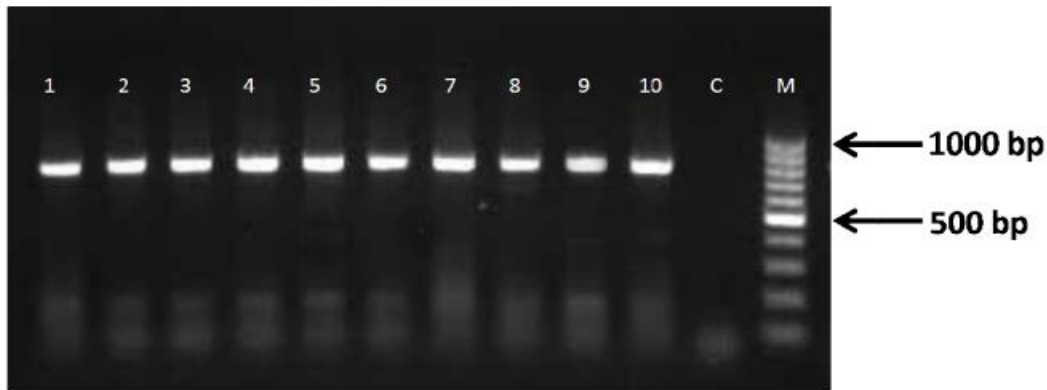
* Numbers with the same letters are not significantly different in each column according to Duncan's Multiple Range Test.

جدول ۹. میانگین تفریح تخم دو جمعیت نماتد سیستی سبب‌زمینی در ارقام سبب‌زمینی مارفونا، دزیره، آگریا و سانه.

Table 9. Mean comparison of egg hatched of potato cyst nematode of two field populations in potato cultivars Marfona, Désirée, Agria and Sante.

Population	Hatched eggs/cysts*	Cultivar	Hatched eggs/cysts*
Ham-Yek 7	1638 a	Sante	1681 a
Ham-Yek 9	1421 a	Agria	1602 a
		Désirée	1481 a
		Marfona	1357.0 a

* Numbers with the same letters are not significantly different in each column according to Duncan's Multiple Range Test.



شکل ۳. قطعه تکثیر شده ناحیه D2-D3 از زیر واحد بزرگ ریبوزومی rRNA تعداد ده جمعیت نماتد سیستی سبب زمینی *Globodera rostochiensis*. 1-10 ده جمعیت نماتد سیستی سبب زمینی، C: کنترل منفی، M: مارکر DNA ۱۰۰ جفت بازی.

Fig 2. Amplified fragment of D2-D3 LSU-rRNA of ten populations of potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*. 1-10 ten populations of potato cyst nematode, C: negative control, M: DNA marker 100 bp.

اروپایی و آمریکای جنوبی گسترش دارد. تاکنون با انتقال ژن مقاومت از ارقام وحشی سیب زمینی به ارقام تجاری سیب زمینی، تعداد زیادی ارقام مقاوم نسبت به پاتوتیپ Ro1 تولید شده است که در مناطق آلوده کشورهای اروپایی و آمریکای جنوبی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ژن مقاوم *HI* مقاومت به پاتوتیپ‌های یک و چهار *G. rostochiensis* را باعث می‌شود (Bakker et al. 2004, Gebhardt et al. 1993).

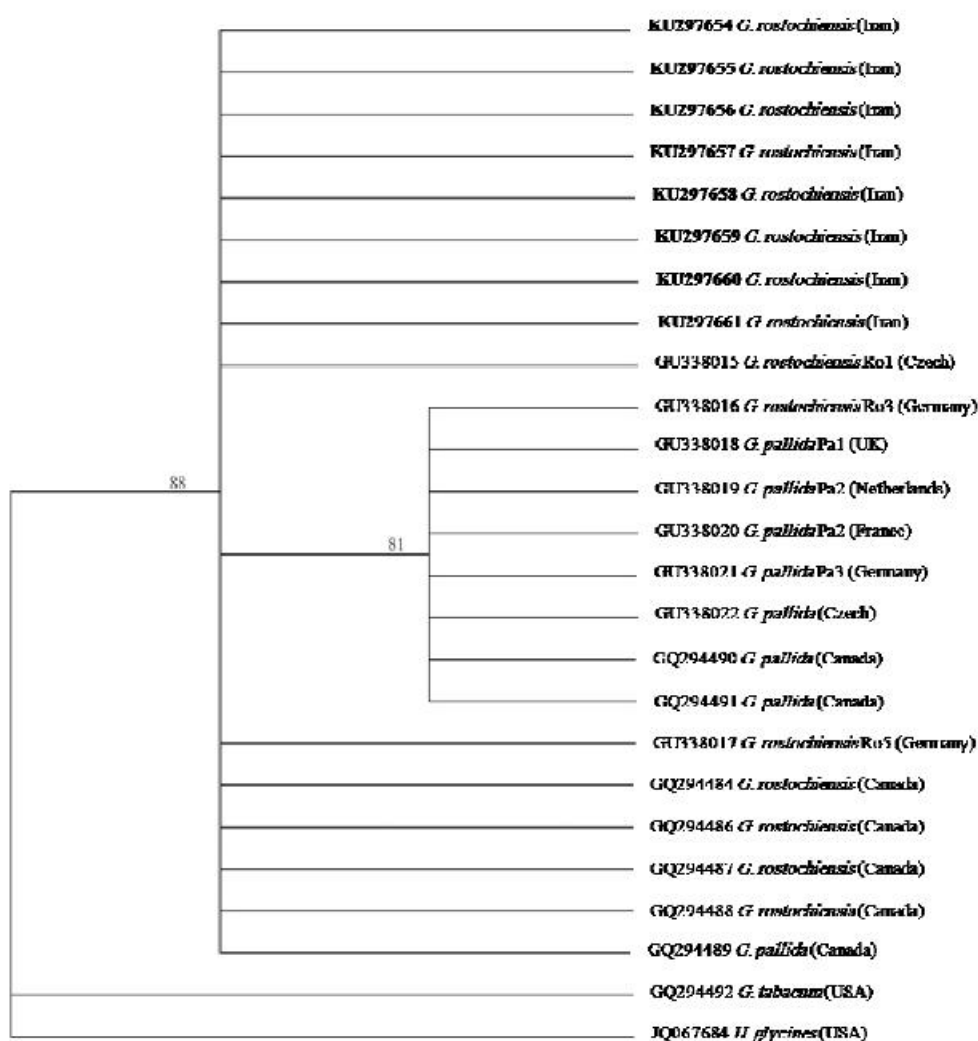
ژن مقاومت *HI* در سال ۱۹۵۲ کشف شد، از آن زمان به بعد به چندین رقم تجاری منتقل شده است. ژن *HI* دارای دوام زیادی است و بعد از گذشت دهه‌ها هنوز این ژن نسبت به *G. rostochiensis* در بسیاری از مناطق فعال است. این ژن تنها ژن مقاومت در نماتد است که تعامل ژن برای ژن در مورد آن به طور ژنتیکی ثابت شده است.

استفاده بسیار گسترده از واریته‌های سیب زمینی با ژن *HI* باعث افزایش گسترش آلودگی به نماتد *G. pallida* می‌شود (Bradshaw et al. 1998, Bryan et al. 2002). مد نظر قرار گرفتن این موضوع در مدیریت نماتد سیستی سیب زمینی در مزارع آلوده منطقه بهار همدان ضروری است تا موجب افزایش فشار انتخاب روی سایر پاتوتیپ‌ها

به نتایج ارزیابی مقاومت و حساسیت نسبی ارقام سائنه و اگر با نسبت به رقم حساس استاندارد دزیره و مارفونا پاتوتیپ نماتد سیستی سیب زمینی در منطقه بهار استان همدان پاتوتیپ شماره یک (Ro1) تشخیص داده شد.

نماتدهای سیستی سیب زمینی بر اساس توانایی شان به تولید مثل روی کلون‌های مختلف ارقام سیب زمینی به پاتوتیپ‌هایی تقسیم می‌شوند که وضعیت این پاتوتیپ‌ها بحث برانگیز است (Phillips & Trudgill 1983, Mugniery et al. 1989) طرح بین‌المللی پاتوتیپ که بوسیله کورت و همکاران ارائه شده است در میان جمعیت‌های اروپایی نماتدهای سیستی سیب زمینی، پنج پاتوتیپ در درون *G. rostochiensis* و سه پاتوتیپ را برای *G. pallida* شناسایی می‌کند (Kort et al. 1977). در حالی که طرح آمریکای لاتین در میان جمعیت‌های آمریکایی این دو گونه به ترتیب چهار و هفت پاتوتیپ را شناسایی می‌کند (Canto-Saenz & Scurrah 1977). اما این طرح‌ها قادر نیستند همه تنوع ژنتیکی معرفی شده به اروپا را منعکس کنند (Bakker et al. 2004).

پاتوتیپ (Ro1) غالب‌ترین پاتوتیپ نماتد سیستی سیب زمینی *G. rostochiensis* است که در اکثر کشورهای



شکل ۴. درخت تبار زایی Maximum Parsimony حاصل از ترادف نوکلئوتیدی ناحیه D2-D3 از زیر واحد بزرگ زن rRNA ۲۵ جمعیت و گونه نماتد سیب زمینی *Globodera rostochiensis*.

Fig 4. Maximum Parsimony tree resulting from analysis of nucleotide sequences of D2-D3 of LSU of rRNA of 25 populations and species of potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*.

صورت مشاهده حتی یک تخم و لارو در زمین، کشت فوراً معدوم شده و تدخین خاک تا شعاع ۸۰۰ متر با نمادکش تیلون انجام شده است (USDA 2007). با توجه به مطالعات انجام شده، میزان آلودگی مزارع سیب زمینی در منطقه بهار همدان بسیار بالاتر از این عدد است، حدود ۱۳/۲ سیست و ۱۰۰ تخم و لارو سن دوم در گرم خاک است که با حداکثر میزان آلودگی قابل پذیرش در دنیا (۱۵

و یا ظهور و گسترش گونه *G. pallida* نگردد. آستانه خسارت اقتصادی نماتد سیستی طلایی سیب زمینی بسته به منطقه، شرایط مزارع، شرایط اقتصادی منطقه و نوع پاتوتیپ موجود در منطقه متفاوت است، برای مثال این رقم در کشور هلند تعداد ۱/۵، در ایتالیا ۲، در انگلستان زیر ۲۰ عدد تخم و لارو در گرم خاک در نظر گرفته می‌شود. در ایالت آیداهوی ایالات متحده آمریکا در

D2-D3 ژن 28S rDNA نسبتاً کم است (Douda et al. 2010)

در درخت فیلوژنی ایجاد شده اختلاف بین پاتوتیپ Ro1 ایران با پاتوتیپ‌های دیگر *G. rostochiensis* کاملاً نشان داده شد. قرار گرفتن پاتوتیپ Ro3 با پاتوتیپ‌های Pa1، Pa2 و Pa3 گونه *G. pallida* از کشورهای انگلستان، فرانسه، هلند و آلمان در یک گروه با نتایجی که دودا و همکاران گرفته‌اند کاملاً مطابقت دارد (Douda et al. 2010)، به طوری که حضور این دو گونه و پاتوتیپ‌ها در کنار هم در یک گروه و پیچیدگی ارتباطی، موضوع بحث دودا و همکاران (۲۰۱۰) نیز بوده است.

در بررسی مدنی و همکاران (Madani et al. 2010) درخت فیلوژنی حاصل از ناحیه D2-D3 جمعیت‌های *G. rostochiensis* و *G. pallida* کلادهای ضعیفی تشکیل دادند و متعاقباً نتیجه‌گیری شده است که این نواحی به قدر کافی اطلاعات ژنتیکی لازم را ندارند تا ارتباط فیلوژنتیکی قوی بتوان در درون جنس *Globodera* ایجاد کرد. اخیراً بوچر و همکاران (Boucher et al. 2013) از مارکر میکروستلایت برای تعیین تنوع ژنتیکی جمعیت‌های نماتد سیستی سیب‌زمینی *G. rostochiensis* که از نقاط مختلف دنیا از جمله آمریکای جنوبی و کانادا جمع‌آوری شده بود، استفاده کرده‌اند و توانسته‌اند تا حدودی تفاوت‌های این جمعیت‌ها را از نظر ژنتیکی مشخص کنند.

هر چند مترادف ناحیه D2-D3 به قدر کافی جامع نیست تا بتواند به روشنی مبدأ این گونه را در ایران مشخص نماید، مطالعات بیشتری از سایر ژن‌های این گونه نظیر ژن میتوکندریایی و مارکر میکروستلایت برای پی بردن به مبدأ و منشأ ورود این گونه به ایران لازم است.

لارو سن دوم یا تخم در گرم خاک) تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارد (Gitty & Tanha Maafi 2011). به علاوه در این بررسی نیز تعداد ۱۰ جمعیت که برای تعیین پاتوتیپ بررسی شدند، آلودگی‌ها بمراتب فراتر از بیشترین رقمی بود که برای آستانه خسارت اقتصادی این نماتد قید شده است.

تفریح تخم نماتدهای سیستی با ترکیباتی که از ریشه گیاه میزبان ترشح می‌شود، تحریک می‌شود، فعال‌ترین این مواد در نوک ریشه‌ها هستند. در نماتدهای سیستی سیب‌زمینی این تحریک مختص گیاهان خانواده سولاناسه است که تحت شرایط محیطی مناسب بیش از ۸۰ درصد باعث تفریح تخم می‌شوند. در غیاب گیاه میزبان نیز تفریح انجام می‌شود ولی میزان آن در مقایسه با گیاه میزبان بسیار کمتر است، به طوری که سالانه به طور متوسط ۳۰ درصد گزارش شده است. تأثیر ارقام مختلف سیب‌زمینی در تفریح تخم متفاوت است در آزمایشی با قرار دادن سیست‌های پاتوتیپ Ro1 *G. rostochiensis* و پاتوتیپ Pa3 *G. pallida* در معرض ترشحات ریشه تعداد ۲۵ رقم سیب‌زمینی، *G. rostochiensis* به خوبی با ترشحات ریشه اکثر ارقام تفریح شد ولی واکنش تفریح گونه دوم به ارقام متغیر بود (Evans 1983). در تحقیق حاضر نیز ارقام مارفونا، دزیره، سانته و آگریا توانستند باعث تفریح تخم سیست‌های پاتوتیپ Ro1 *G. rostochiensis* شوند و تفاوت معنی‌داری را در میزان تفریح در اکثر آزمایش‌ها نشان ندادند.

ساختار ناحیه D2-D3 ژن 28S-rDNA برای حل مشکلات تاکسونومیک در سطوح مختلف می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد، هر چند در مورد گونه‌های نماتدهای سیستی سیب‌زمینی، تنوع پاتوتیپ‌های این گونه‌ها در ناحیه

- Anonymous 2007. Council Directive 2007/33/EC of 11 June 2007 on the control of potato cyst nematodes and repealing Directive 69/465/EEC. Official Journal of the European Union 156: 12-16.
- Bakker E., Achenbach U., Bakker J., van Vliet J., Peleman J., Segers B., van der Heijden S., van der Linde P., Graveland R., Hutten R., van Eck H., Coppoolse E., van der Vossen E., Bakker J. and Govers A. 2004. A high-resolution map of the *HI* locus harbouring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Theoretical and Applied Genetics 109: 146-152.
- Boucher A. C., Mimee B., Montarry J., Bardou-Valette S., Bélair G., Moffett, P. and Grenier G. 2013. Genetic diversity of the golden potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* and determination of the origin of populations in Quebec, Canada. Molecular Phylogenetics and Evolution 69 (1): 75-82.
- Bradshaw J. E., Hackett C. A., Meyer R. C., Milbourne D., McNicol J. W., Phillips M. S. and Waugh R. 1998. Identification of AFLP and SSR markers associated with quantitative resistance to *Globodera pallida* (Stone) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) with a view to marker-assisted selection. Theoretical and Applied Genetics 97: 202-210.
- Brodie B. B. 1984. Nematode parasites of potato, pp 169-181. In: W. R. Nickle, (Ed.). Plant and insect nematodes. Marcell Dekker. Inc. USA.
- Brodie B. B. 1999. Classical and molecular approaches for managing nematodes affecting potato. Canadian Journal of Plant Pathology 21: 222-230.
- Brodie B. B. and Mai W. F. 1989. Control of the golden nematode in the United States. Annual Review of Phytopathology 27: 443-461.
- Bryan G. J., McLean K., Bradshaw J. E., De Jong W.S., Phillips M., Castelli L. and Waugh R. 2002. Mapping QTLs for resistance to the cyst nematode *Globodera pallida* derived from the wild potato species *Solanum vernei*. Theoretical and Applied Genetics 105: 68-77.
- Canto-Saenz M. and De Scurrah M. M. 1977. Races of the potato cyst nematode in the Andean region and a new system of classification. Nematologica 23: 340-349.
- Douda O., Zouhar M., Novakova E., Mazakova J. and Ryšánek P. 2010. Variability of D2/D3 segment sequences of several populations and pathotypes of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis*, *Globodera pallida*). Plant Protection Science 46: 171-180.
- Ellenby C. 1954. Tuber forming species and varieties of the genus *Solanum* tested for resistance to the potato root eelworm *Heterodera rostochiensis* Wollenweber. Euphytica 3: 195-202.
- Evans K. 1983. Hatching of potato cyst nematodes in root diffusates collected from twenty-five potato cultivars. Crop Protection 2: 97-103.
- FAOSTAT. 2013. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx>. 18.07.2016.
- Fenwick D. W. 1949. Investigations on the emergence of larvae from cysts of the potato-root eelworm *Heterodera rostochiensis*. Technique and variability. Helminthology 23: 157-170.
- Fullaondo A., Barrena E., Viribay M., Barrena I., Salazar A. and Ritter E. 1999. Identification of potato cyst nematode species *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* by PCR using specific primer. Nematology 1: 157-163.
- Gebhardt C., Mugniery D., Ritter E., Salamini F. and Bonnel E. 1993. Identification of RFLP markers closely linked to the *HI* gene conferring resistance to *Globodera rostochiensis* in potato. Theoretical and Applied Genetics 85: 541-544.
- Gitty M and Tanha Maafi Z. 2008. Occurrence of potato cyst nematode in Hamadan Province. Proceeding of 18th Plant Protection Congress, Vol. 2 Plant Diseases and weeds p: 604.
- Gitty M. and Tanha Maafi Z. 2010. First report of a potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, on potato, in Iran. Plant Pathology 59: 412.
- Gitty M., Tanha Maafi Z., Arjmandian A. and Pischevar S. 2011. Occurrence of potato golden cyst nematode in Iran and its distribution in Hamadan Province. Agricultural Biotechnology 10 (1): 13-14 [53-61]. (in Persian with English Summary).
- Kort J., Ross H., Rumpfenhorst H. J. and Stone A. R. 1977. An international scheme for identifying and classifying pathotypes of potato cyst-nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. Nematologica 23: 333-339.

- Madani M., Subbotin S. A, Ward L. J. L. X. and De Boer, S. H. 2010. Molecular characterization of Canadian populations of potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* using ribosomal nuclear RNA and cytochrome b genes. *Canadian Journal of Plant Pathology* 32: 252-263.
- Mugnieri D., Phillips M. S., Rumpfenhorst H. J., Stone A. R. Treur A. and Trudgill D. L. 1989. Assessment of partial resistance of potato to, and pathotype and virulence differences in potato cyst nematodes. *EPPO Bulletin* 19: 7-25.
- OEPP/EPPO. 2004. *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 34: 309-314.
- Phillips M. S. and Trudgill D. L. 1983. Variations in the ability of *Globodera pallida* to produce females on potato clones bred from *Solanum vernei* or *S. tuberosum* ssp. *andigena* CPC2802. *Nematologica* 29: 217-226.
- Sasser J. N. 1989. Plant-parasitic nematodes. The farmer's hidden enemy. North Carolina State University Graphics. Raleigh. North Carolina. 115 p.
- Sasser J. N. and Freckman D. 1987. A world perspective on nematology. The Role of Society, pp 7-14. In: J. Veech, and D. W. Dickson, (Eds). *Vistas on nematology*. Society of Nematologists. Hyattsville. Maryland USA.
- Subbotin S. A., Sturhan D., Chizhov V. N., Vovlas N. and Baldwin, J. G. 2006. Phylogenetic analysis of Tylenchida Thorne, 1949 as inferred from D2 and D3 expansion fragments of the 28S rRNA gene sequences. *Nematology* 8: 455-474.
- Tanha Maafi Z., Subbotin S. A. and Moens M. 2003. Molecular identification of cyst-forming nematodes (Heteroderidae) from Iran and a phylogeny based on ITS-rDNA sequences. *Nematology* 5: 99-111.
- USDA. 2007. Potato Cyst Nematode National Survey and Diagnostic Cyst sample Forwarding Protocols. 27 p.
- Wouts W. M. and Baldwin J. G. 1998. Taxonomy and identification, pp. 83-122. In: S. B. Sharma, (Ed). *The cyst nematodes*. Kluwer Academic Publishers, The Netherland.