

تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای جمعیت‌های مختلف نماتد *Meloidogyne javanica* در مزارع گوجه‌فرنگی استان خراسان شمالی با استفاده از نشانگر RAPD-PCR

قاسم فدوی خلجلو*، عصمت مهدیخانی مقدم، حمید روحانی
گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

به منظور شناسایی نماتدهای ریشه‌گرهی گوجه‌فرنگی در استان خراسان شمالی، طی سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ تعداد ۲۱ جمعیت از نماتدهای ریشه‌گرهی از ریشه گوجه‌فرنگی در مناطق مختلف استان خراسان شمالی جمع‌آوری و شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌های بالغ و خصوصیات مرفولوژیکی لاروهای سن دو از لحاظ خصوصیات مرفولوژیکی مطالعه و تنوع قابل ملاحظه‌ای بین جمعیت‌های مختلف این گونه مشخص نگردید. به منظور مطالعات مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای *Meloidogyne javanica*، گونه مذکور در گلخانه تکثیر شد. پس از خالص‌سازی و تکثیر نماتد بر روی رقم حساس گوجه‌فرنگی (Red colud) در گلخانه، تخم‌ها و لاروهای سن دوم هر ریشه جدا و به عنوان یک جمعیت در نظر گرفته شد. پس از استخراج DNA ژنومی نتایج بررسی‌های مرفولوژیکی توسط آغازگرهای اختصاصی گونه *M. javanica* ارزیابی و برای بررسی میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف این گونه از روش RAPD استفاده شد. فرآورده‌های حاصل از واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۷ درصد الکتروفورز و چند شکلی‌های به وجود آمده از DNA هر جمعیت در این تکنیک، بر اساس وجود یا عدم وجود باند به صورت داده‌های صفر و یک ثبت گردید و سپس ماتریس تشابه بر مبنای ضریب شباهت Dice محاسبه شد. جهت بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها، ماتریس فاصله ژنتیکی تشکیل و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA در نرم‌افزار NTSYS انجام شد. دندروگرام حاصل از داده‌های RAPD در سطح تشابه ۷۳٪ به پنج گروه اصلی تقسیم شد. با توجه به نتایج کلی، نشانگر RAPD توانست ۷۳٪ تشابه و ۲۷٪ تفاوت بین جمعیت‌های مختلف گونه مورد مطالعه را نشان دهد.

واژه‌های کلیدی: *Meloidogyne javanica* RAPD-PCR، تنوع ژنتیکی، خراسان شمالی، گوجه‌فرنگی

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: g.fadvi@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۴/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۱۴

مقدمه

گوجه‌فرنگی به لحاظ ارزش دلاری دومین محصول در بین سبزی‌های مهم دنیا است. تولید جهانی آن از ۸۸/۵۲۸ میلیون تن در سال ۱۹۹۵ به ۱۳۰/۶۴۹ میلیون تن در سال ۲۰۰۸ و در ایران از ۲/۴ میلیون تن به حدود ۵/۵ میلیون تن رسیده است. سطح زیر کشت گوجه‌فرنگی در استان خراسان شمالی ۳۷۲۴ هکتار و تولید آن ۱۰۳۷۸۲ تن در سال می‌باشد (Anonymous, 2011). گوجه‌فرنگی نیز مانند سایر گیاهان مورد حمله عوامل بیماری‌زای مختلف از جمله نماتدها قرار می‌گیرد. که در این بین نماتدهای ریشه‌گرهی باعث بروز خسارت‌های جدی در مزارع گوجه‌فرنگی می‌شوند. نماتدهای ریشه‌گرهی متعلق به جنس *Meloidogyne Goeldi*, 1887 پارازیت‌های اجباری گروهی از گیاهان با ارزش اقتصادی هستند که در تمام مناطق جهان دارای پراکندگی هستند و دامنه میزبانی آن‌ها بیش از ۳۰۰۰ گونه گیاهی را شامل می‌شود (Jepson, S, B., 1987). اگرچه تاکنون خصوصیات بیش از ۹۰ گونه از جنس *Meloidogyne* شرح داده شده است، اما چهار گونه *M. javanica*، *M. arenaria*، *M. incognita* و *M. hapla* از نظر اقتصادی بیشترین اهمیت را دارا هستند (Sikora et al., 2005).

در ایران (Noori (1995) گونه *Meloidogyne javanica* را همراه با سایر نماتدها از روی گوجه‌فرنگی و سایر سبزی‌های در منطقه کرج، (Barooti (1997) گونه *M. javanica* را از روی گوجه‌فرنگی در استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی و مغان، (Mahdikhani Moghadam et al. (2003) گونه *M. javanica* را از روی گوجه‌فرنگی، در مناطق مختلف کشور، (Pakniat (2006) گونه‌های *M. javanica* و *M. incognita* را در مزارع و گلخانه‌های گوجه‌فرنگی استان فارس، (Davarian et al., 2008) گونه‌های *M. javanica* و *M. incognita* را از روی گوجه‌فرنگی در استان گلستان، (Salahi Ardakani (2010) گونه‌های *M. javanica* و *M. incognita* را در گلخانه‌ها و مزارع گوجه‌فرنگی استان کهگیلویه و بویراحمد، (Ahmadi et al. (2012) گونه *M. javanica* را از مزارع گوجه‌فرنگی و سایر سبزی‌های در استان خوزستان و (Karkhaneh et al. (2012) گونه *M. javanica* را از گلخانه‌های گوجه‌فرنگی در استان کرمانشاه گزارش کرده‌اند. برای شناسایی و تفکیک گونه‌ها و نژادهای جنس *Meloidogyne* علاوه بر خصوصیات مورفولوژیکی و مرفومتريکی، سیتولوژیکی، اکولوژیکی و بیماری‌زایی روی میزبان‌های افتراقی، از روش‌های مولکولی RAPD-PCR، RFLP-PCR و SCAR-PCR نیز استفاده می‌شود (Fargette et al., 1997; Zijlstra et al., 2000). Powers et al. (1993) با استفاده از PCR پنج گونه *Meloidogyne incognita*، *M. arenaria*، *M. javanica* و *M. hapla* را شناسایی کردند. گونه *M. incognita* و *M. javanica* هر دو تولید باند ۱/۷ کیلو بازی، گونه *M. arenaria* باند ۱/۱ کیلو بازی و گونه‌های *M. chitwoodi*

M. hapla هر دو تولید باند ۰/۵۲ کیلو بازی کردند. همچنین در این مطالعه برای متمایز کردن گونه‌های *M. incognita* و *M. javanica* از یکدیگر و تفکیک دو گونه *M. chitwoodi* و *M. hapla* از هم، محصول واکنش PCR در معرض آنزیم‌های برشی قرار گرفت و گونه‌ها از هم تفکیک گردیدند.

(Fargette et al. 1997) تنوع ژنتیکی بین گونه‌های جنس *Meloidogyne* و جمعیت‌های داخل یک‌گونه در مناطق گرمسیری را با استفاده از روش RAPD مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد در گونه *M. arenaria* علی‌رغم یکسان بودن مناطق جغرافیایی جمع‌آوری نمونه‌ها، بیشترین تنوع درون گونه‌ای را داشتند. ولی تنوع در گونه‌های *M. incognita* و *M. javanica* علی‌رغم متفاوت بودن مناطق جغرافیایی جمع‌آوری کم بود. (Zijlstra et al. 2000) جهت تعیین ترادف‌های مشخص از DNA گونه‌های *M. incognita*، *M. javanica* و *M. arenaria* و همچنین طراحی آغازگرهای اختصاصی از روش RAPD-PCR استفاده کردند. و با استفاده از ۱۲ جفت آغازگر، DNA جمعیت‌های مختلف سه گونه مذکور را بررسی کردند. همه آغازگرها تولیدات تکثیری خوب و الگوهای بانندی متفاوتی برای این سه گونه ایجاد نمودند. از بین این ۱۲ جفت آغازگر، ۳ جفت آغازگر OPA-12، OPA-06 و OPA-01 به ترتیب آغازگرهای اختصاصی گونه‌های *M. incognita*، *M. arenaria* و *M. javanica* بوده و آن‌ها را به خوبی شناسایی و از هم تفکیک کردند. (Fourie et al. 2001) گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی در آفریقای جنوبی را شناسایی و با استفاده از تکنیک‌های SCAR-PCR و ITS-PCR آن‌ها را از یکدیگر تفکیک نمودند و تکنیک SCAR-PCR توانست موقعیت گونه‌ها را به خوبی مشخص کند. (Dong et al. 2001) جهت طراحی و تولید آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی گونه‌های *M. arenaria*، *M. hapla*، *M. incognita* و *M. javanica*، از روش RAPD-PCR استفاده کردند. آن‌ها ۲۶ جمعیت مختلف از کشورهای اروپایی و آفریقایی را توسط ۱۲۰ آغازگر تصادفی مورد بررسی قرار دادند. چند شکلی‌های به دست آمده بین این جمعیت‌ها را بررسی نمودند و سپس باندهای تخصصی برای هر گونه را کلون و تعیین توالی کردند و بر اساس توالی‌های به دست آمده آغازگر اختصاصی گونه تعیین گردید. (Tesarova et al. 2003) جهت شناسایی اختصاصی گونه *M. incognita* از دیگر گونه‌های این جنس، از آغازگر ۲۰ نوکلئوتیدی اختصاصی گونه استفاده کردند. بعد از انجام واکنش PCR، تولیدات تکثیری بر روی ژل آگارز ۱٪، الگوی بانندی ۵۰۲ جفت بازی را در جمعیت‌های مختلف *M. incognita* ایجاد کردند.

در ایران، (Mahdikhani Moghadam et al. 2006) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه و با روش PCR-RFLP جمعیت‌های مختلف دو گونه *M. javanica* و *M. incognita* را مورد مقایسه قرار دادند. پس از انجام واکنش قطعات تکثیری با آنزیم‌های محدود کننده AluI،

DraI و Hinf I برش داده شد. دو آنزیم محدود کننده AluI و DraI هیچ گونه برشی در طول قطعه DNA تکثیر شده ایجاد نکردند اما آنزیم Hinf I در جمعیت‌های *M. javanica* قطعه ۱/۷ کیلو باز را به دو قطعه ۰/۷ و ۰/۳ کیلو باز و در جمعیت‌های *M. incognita* قطعه ۱/۷ کیلو باز را به سه قطعه ۰/۴، ۰/۳ و ۰/۳ کیلو باز برش داد و تفاوتی بین جمعیت‌های مختلف هر گونه مشاهده نشد. همچنین Askarian *et al.* (2006) جمعیت‌های مختلف گونه *M. javanica* جمع‌آوری شده از روی درختان پسته کرمان را با روش RAPD-PCR مورد مطالعه قرار دادند، از میان ۳۰ آغازگر تصادفی مورد استفاده، ۱۰ آغازگر چند شکلی خوبی را بین جمعیت‌های مختلف *M. javanica* ایجاد کردند. که بیشترین تعداد باند چند شکل مربوط به آغازگر OPA-10 و کمترین تعداد باند چند شکل مربوط به آغازگر OPA-08 بود، آن‌ها با استفاده از تکنیک مذکور سطح تشابه ۹۱ تا ۱۰۰٪ را در بین جمعیت‌های مختلف گونه مذکور به دست آوردند. Rafiei *et al.* (2010) در بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای *M. cruciani* با استفاده از نشانگر RAPD-PCR، ۷۱ تا ۹۱٪ تشابه و ۸ تا ۲۹٪ تفاوت بین جمعیت‌های این گونه نشان دادند. در این تحقیق، هدف بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای بین جمعیت‌های مختلف گونه *M. javanica* جمع‌آوری شده از مزارع گوجه‌فرنگی استان خراسان شمالی با استفاده از روش RAPD-PCR بوده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تعداد ۲۱ جمعیت از نماتدهای ریشه‌گرهی از ریشه گوجه‌فرنگی در مناطق مختلف استان خراسان شمالی جمع‌آوری و سپس شناسایی گونه‌ها بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی و مرفومتریکی شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌ها و لاروهای سن دوم صورت گرفت. پس از تهیه برش از انتهای بدن ماده‌های بالغ، توده‌های تخم هر یک از ماده‌ها به طور جداگانه در آب مقطر در دمای ۲۸ درجه سلسیوس درون انکوباتور قرار داده شد. پس از تفریح تخم‌ها، جهت کشتن و ثابت کردن لاروهای سن دوم از روش تکمیل شده (De Grisse, 1969, Seinhorst, 1959) استفاده گردید و پس از تهیه اسلاید از لاروهای سن دوم و شبکه کوتیکولی انتهای بدن، با استفاده از میکروسکوپ مجهز به لوله ترسیم، مشخصات مرفولوژیکی و مرفومتریکی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. جهت خالص‌سازی، پتری‌های حاوی توده تخم درون انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شد. تا این که تخم‌ها تفریح و لاروهای سن دوم از تخم‌ها خارج گردید. پس از خروج حداکثر لاروها از تخم، سوسپانسیون لاروها به گلخانه منتقل و هر سوسپانسیون به طور جداگانه در مجاورت ریشه یک نشاء حساس گوجه‌فرنگی (رقم Red colud) قرار داده شد. پس از ۷۰ روز ریشه‌های گوجه‌فرنگی از خاک خارج و پس از شستشو با آب ملایم، از شبکه کوتیکولی انتهای بدن نماتدهای ماده بالغ برش

تهیه و همچنین با توجه به خصوصیات لاروهای سن دوم، از خالص‌سازی و صحت‌گونه موردنظر اطمینان حاصل گردید. سپس جمعیت‌های مختلف گونه *M. javanica* روی ریشه‌های سالم گوجه‌فرنگی رقم (Red colud) در گلخانه تکثیر و از نمونه‌های خالص جهت استخراج DNA استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱- مشخصات جمعیت‌های مورد مطالعه نماتد *M. Javanica* از نظر محل و تاریخ جمع‌آوری و کد مولکولی

Table 1. Characteristics of the study populations of *M. javanica* in terms of location and date of collection and the molecular code.

Row	Collection	Date	Molecular code
2	North Reza abad-Shirvan	2009	Tre
3	Barzoo-Shirvan	2009	Tbarz
4	Todeh-Shirvan	2009	Tto
5	Tanasovan-Shirvan	2010	Tta
6	Ghalecheh-Shirvan	2010	Tgh
7	Zyarat-Shirvan	2009	Tzy
8	Mataranlo-Bojnourd	2009	Tma
9	Khoshmanzar-Bojnourd	2009	Tkh
10	Hesar-Garmkhan-Bojnourd	2009	The
11	Ghazi-Bojnourd	2009	Tgh
12	Biar-Ashkhaneh	2009	Tbi
13	Shirabad-Ashkhaneh	2009	Tsh
14	Mola Hassan-Ashkhaneh	2009	Tmo
15	Azadegan-Ashkhaneh	2010	Taz
16	Islam abad-Ashkhaneh	2010	Tes
17	Shahr abad-Maneh&Semelghan	2010	Tsh
18	Jafar abad-Farouj	2010	Tja
19	Bargerd-Farouj	2010	Tbarg
20	Farouj	2010	Tfa ₁
21	Farouj	2010	Tfa ₂

برای استخراج DNA ژنومی از روش Tanha Maafi *et al.* (2003) با مقداری تغییرات استفاده شد. تعدادی لارو سن دوم به میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری حاوی ۸۱ μl آب مقطر دو بار تقطیر منتقل شدند. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰- درجه سلسیوس قرار داده شدند، سپس لاروها با استفاده از ورتکس خرد شدند. در این مرحله مقدار ۱۰ μl بافر استخراج (500 mM KCl، 100 mM Tris-Hcl pH 8، 15 mM MgCl2، 4.5% Tween 20 و 0.05% mercapto ethanol) به آنها اضافه شد. پس از افزودن ۲ μl پروتئیناز K (600 μg/ml) میکروتیوب‌ها در ترموسایکلر به مدت یک ساعت در دمای ۶۵ درجه سلسیوس و ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از انجام سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، نمونه‌ها در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شدند. به منظور تکثیر DNA جمعیت‌های مختلف *M. javanica* در واکنش PCR، از آغازگرهای اختصاصی OPAFjav و OPARjav استفاده شد (جدول ۲). این آغازگرها بر پایه روش SCAR

و با توجه به آنالیز RAPD معرفی شده‌اند و دارای توانایی بالایی در تشخیص گونه *M. javanica* می‌باشند (Zijlstra *et al.*, 2000). این جفت آغازگر یک قطعه ۶۷۰ جفت بازی را در کلیه جمعیت‌های گونه *M. javanica* تکثیر نمود و این گونه را متمایز نمود. توالی این آغازگرها به صورت زیر است:

OPAFjav (5'- GGTGCGCGATTGAACTGAGC -3')
OPARjav (5'- CAGGCCCTTCAGTGGAACTATAC -3')

نتایج حاصله، با نتایج به دست آمده توسط Zijlstra *et al.* (2000) مطابقت دارد. همچنین شاهد منفی که تمام اجزای واکنش PCR به جز DNA را داشت هیچ بانندی را تولید نکرد. این آغازگرها به منظور آزمون شناسایی مورفولوژیکی مورد استفاده قرار گرفتند و شناسایی مورفولوژیکی جمعیت‌های مختلف این گونه را تأیید می‌کنند (شکل ۱).

جدول ۲- اجزا واکنش PCR برای آغازگرهای OPAFjav و OPARjav

Table 2. Reaction components for PCR primers OPARjav and OPAFjav

Consumables materials	Amount used
PCR Buffer(10x)	2.5µl
25mM(MgCl ₂)	1µl
10 mM dNTPs	0.5µl
DNA template	1µl
Forward primer	1µl
Backward primer	1µl
Taq enzymes	0.3µl
Sterile distilled water	17.7µl
The final volume	25µl

مخلوط واکنش طبق جدول ۳ درون میکروتیوب‌های ۰/۲ ml ریخته شد.

جدول ۳- برنامه PCR برای آغازگرهای OPAFjav و OPARjav

Table 3. PCR program for primers OPAFjav and OPARjav

Reaction stage	Time	Temperature	Number of cycles
Initial denaturing	2min	94 ⁰ C	1
Denaturing	30sec	94 ⁰ C	35
Annealing	30sec	64 ⁰ C	35
Extension	1min	72 ⁰ C	35
Final extension	5min	72 ⁰ C	1

برای انجام آزمون RAPD از میان ۲۳ آغازگر استفاده شده، ۱۰ آغازگر که الگوهای بانندی متفاوت در جمعیت‌های مختلف نماتد گره ریشه تولید کردند، انتخاب شدند (جدول ۴). مخلوط واکنش RAPD- PCR در جدول ۵ نشان داده شده‌اند.

جدول ۴- توالی و اسامی آغازگرهای مورد استفاده در آزمون RAPD

Table 4. Sequences and names of primers used in the RAPD test

Primers	Sequences
OPA-17	5'- GAC CGC TTG T- 3'
OPA-18	5'- AGG TGA CCG T- 3'
OPA-14	5'- CTC GTG CTG G- 3'
OPA-16	5'- AGC CAG CGA A- 3'
OPD-11	5'- AGC GCC ATT G- 3'
OPE-18	5'- GGA CTG CAG A- 3'
OPA-09	5'- GGG TAA CGC C- 3'
OPA-03	5'- AGT CAG CCA C- 3'
OPA-04	5'- AAT CGG GCT G- 3'
M-13	5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT- 3'

جدول ۵- اجزاء واکنش PCR برای آزمون RAPD

Table 5. PCR reaction components for the RAPD test.

Consumables materials	Amount used
PCR Buffer(10x)	2.5µl
25mM(MgCl ₂)	1.2µl
10 mM dNTPs	0.5µl
DNA template	2µl
Forward primer	1µl
Backward primer	1µl
Taq enzymes	0.3µl
Sterile distilled water	16.5µl
The final volume	25µl

مخلوط واکنش درون میکروتیوب‌های ۰/۲ ml ریخته شد. برنامه PCR در جدول ۶ آورده شده است.

جدول ۶- برنامه PCR برای واکنش RAPD

Table 6. PCR program for RAPD reaction

Reaction stage	Time	Temperature	Number of cycles
Initial denaturing	5min	94 ⁰ C	1
Denaturing	1min	94 ⁰ C	40
Annealing	1min	35 ⁰ C	40
Extension	2min	72 ⁰ C	40
Final extension	5min	72 ⁰ C	1

الکتروفورز نمونه‌ها در ژل آگارز ۱/۷٪، ولتاژ ۷۵ و به مدت ۳ ساعت انجام شد و سپس ژل در اتیدیوم بروماید (۰/۵ µg/ml) به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و پس از شستشو با آب مقطر در دستگاه UV transiluminator تحت نور ماوراءبنفش عکس‌برداری شد. تصاویر تهیه شده از ژل‌های الکتروفورز محصولات PCR که در آن قطعات تکثیر یافته توسط هر آغازگر به صورت باندهایی از یکدیگر تفکیک شده بودند، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. هر باند به عنوان یک لوکوس با دو آلل {حضور باند (یک) و عدم حضور باند (صفر)} در نظر گرفته شد. عکس‌های به دست آمده از دستگاه UV transiluminator به صورت چشمی و مشاهده‌ای تجزیه و تحلیل شدند. در این بررسی کلیه باندهای چند شکل اعم از ضعیف یا قوی و یا قابل

دیدن انتخاب و داده‌های مذکور توسط نرم‌افزار NTSYS_{pc} V. 2.02 و بر مبنای ضریب تشابه دایس مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی تنوع بین جمعیت‌ها، ماتریس تشابه به ماتریس فاصله ژنتیکی تبدیل و تجزیه خوشه‌ای به روش میانگین حسابی غیروزنی (UPGMA) با نرم‌افزار مذکور انجام و نتایج تجزیه خوشه‌ای در یک دندروگرام خلاصه شد.

نتایج و بحث

جهت شناسایی جنس *Meloidogyne* علاوه بر مشخصات شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌های بالغ از لاروهای سن دوم نیز استفاده شد. پس از اندازه‌گیری طول و عرض بدن و طول گردن ماده‌های بالغ، از برش انتهای بدن ماده‌های بالغ اسلاید میکروسکوپی تهیه شد مشخصات مورفولوژیکی و مورفومتریکی آن مانند، شکل عمومی و کلی شبکه، وجود یا عدم وجود خطوط جانبی، فرورفتگی در محل خطوط جانبی، ارتفاع کمان پشتی و شکل آن، وجود یا عدم وجود نقاط در ناحیه دم، شکل شیار، ظریف یا ضخیم بودن شیارها، پیوستگی یا عدم پیوستگی شیارها، اندازه فرج، فاصله فرج تا مخرج، فاصله فاسمیدها، مشخص بودن انتهای دم و شکل آن، طول کمان پشتی، طول و عرض شبکه کوتیکولی، فاصله شیارها از هم، وجود یا عدم وجود شیارهای متصل به ناحیه فرج، مورد بررسی قرار گرفت. گونه مورد بررسی *Meloidogyne javanica* شناسایی گردید (جدول ۷، شکل ۳).

در این تحقیق از میان ۲۳ آغازگر مورد استفاده، ۱۰ آغازگر OPA18, M13, OPA17, OPA4, OPA3, OPA9, OPE18, OPD11, OPA16 و OPA14، بین جمعیت‌های مختلف گونه *M. javanica* چند شکلی نشان دادند. ده آغازگر مورد آزمون ۱۵۳ باند ایجاد نمودند. آغازگر OPA4 با ایجاد ۱۰ باند چند شکلی بیشترین چند شکلی را نشان داد و آغازگرهای OPA18 و OPD11 تنها یک باند تولید نمودند (جدول ۸، شکل ۲).

جدول ۷- خصوصیات مورفومتریکی شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌های بالغ و لاروهای سن ۲، گونه *Meloidogyne javanica* از استان خراسان شمالی (اندازه‌ها بر حسب میکرومتر)

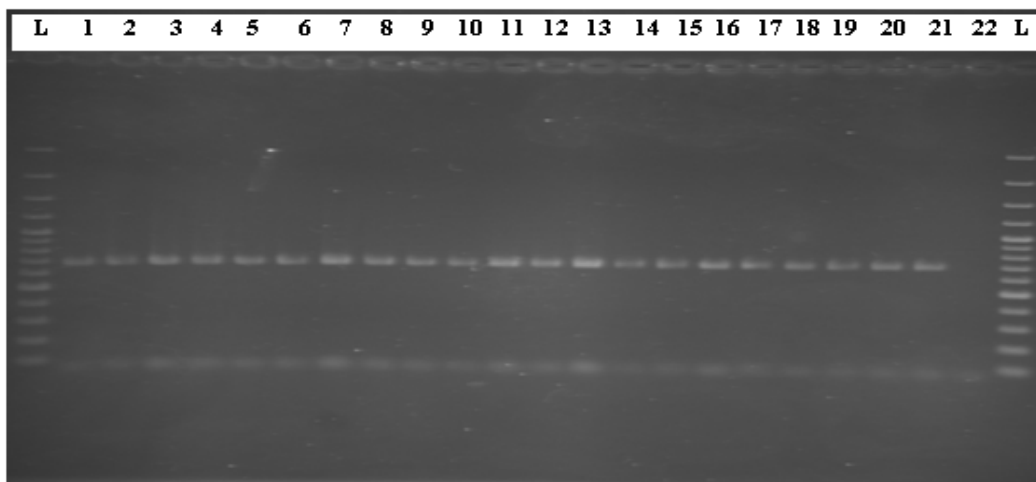
Table 7. Morphometric characteristics on perineal patterns of adult females and J2s of *Meloidogyne javanica* in North Khorasan province (Measurements are in μm)

Species	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
Characters	Female	J2
N	17	20
a	(1.65-1.81)1.71±0.05	(28.8-32.8)31.01±1.28
b	-	(4.07-6.7)5.19±1.01
b'	-	(3.3-5.6)4.4±0.73
c	-	(7.5-9.2)8.34±0.61
c'	-	(4.6-6.4)5.5±0.61
Body length	(730-850)798.7±43.9	(390-460)427.91±23.20
Body width	(440-491)465.8±18.1	(13-15)13.79±0.72
Neck length	(180-215)198.6±12.2	-
Stylet length	(14-16)15.12±0.58	(10-13)12.12±1.04
Stylet knob height	(2.2-2.4)2.31±0.06	(1.2-1.4)1.23±0.06
Stylet knob width	(2.1-2.3)2.18±0.08	(2-2.2)2.07±0.06
DGO	(3-5)3.68±0.75	(2.1-4)2.96±0.61
Tail length	-	(42-61)51.41±5.38
Tail width	-	(8-10)9.20±0.58
Hyaline length	-	(12-18.5)15.20±2.02
Anterior end to excretory pore	(42-51)46.87±2.85	-
Anterior end to centre of median bulb	(89-102)94±3.92	-
Vulval slit length	(20-29)24.91±2.39	-
Distance vulval slit to anus	(17-22)20.25±1.71	-
Interphasmidial distance	(20-25)22.87±1.95	-

جدول ۸- تعداد و اندازه باندهای تولید شده توسط آغازگرهای RAPD

Table 8. Size and number of bands generated by RAPD primers.

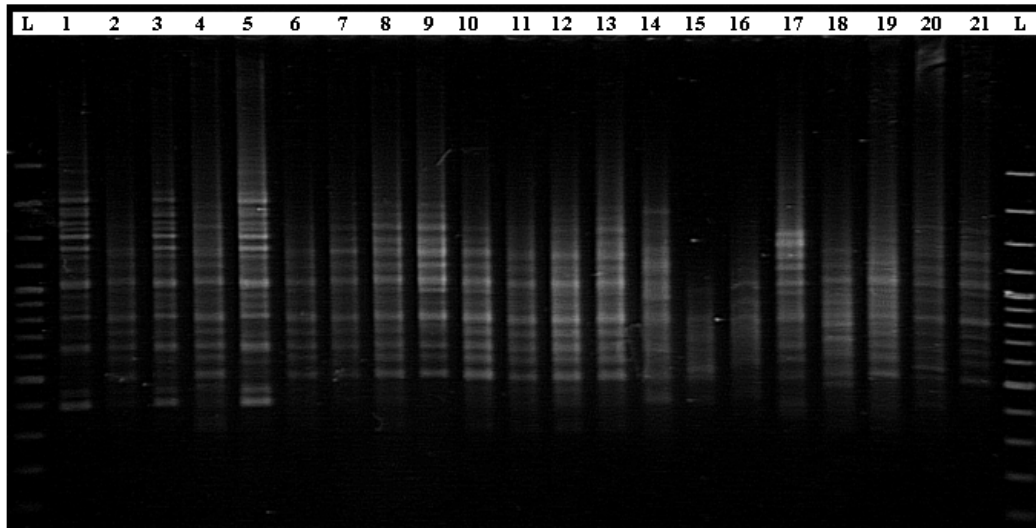
Primers	The total number of bands generated	Number of polymorphic bands	Size bands(bp)
OPA-17	12	4	400-2900
M-13	13	3	350-2700
OPA-18	15	1	300-2700
OPA-14	16	7	300-2700
OPA-16	17	9	300-2700
OPD-11	12	1	300-2700
OPE-18	16	3	350-2700
OPA-09	18	7	300-2700
OPA-03	17	8	300-2700
OPA-04	17	10	350-2700



شکل ۱- تکثیر باند ۶۷۰ جفت باز توسط آغازگر اختصاصی گونه *M. javanica*

Figure 1. Band of 670 bp was amplified by specific primers of *M. javanica*

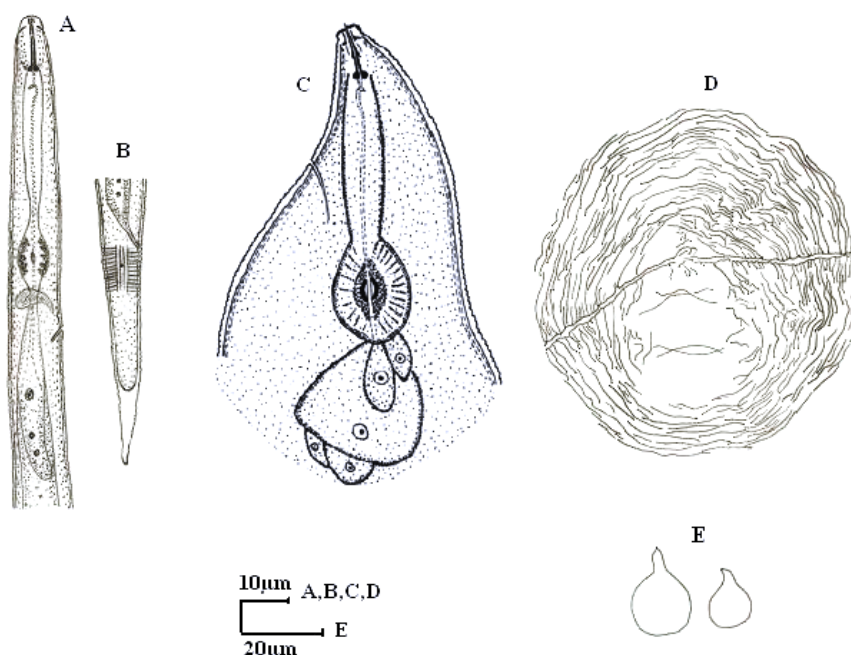
L- ladder 100bp, 1- Tam , 2- Tre , 3- Tbarz , 4- Tto, 5- Tta, 6- Tgh, 7- Tzi, 8- Tma, 9- Tkh, 10- The, 11- Tgh, 12- Tbi, 13- Tsh, 14- Tmo, 15- Taz, 16- Tes, 17- Tsh, 18- Tja, 19- T barg, 20- Tfa₁, 21- Tfa₂, 22- C



شکل ۲- الگوی نشانگر RAPD با استفاده از آغازگر OPE18 در مورد جمعیت‌های مختلف *M. javanica*

Figure 2. The pattern of RAPD markers in different populations using primers OPE18 of *M. javanica*

L- ladder 100bp, 1- Tam , 2- Tre , 3- Tbarz , 4- Tto, 5- Tta, 6- Tgh, 7- Tzi, 8- Tma, 9- Tkh, 10- The, 11- Tgh, 12- Tbi, 13- Tsh, 14- Tmo, 15- Taz, 16- Tes, 17- Tsh, 18- Tja, 19- T barg, 20- Tfa₁, 21- Tfa₂

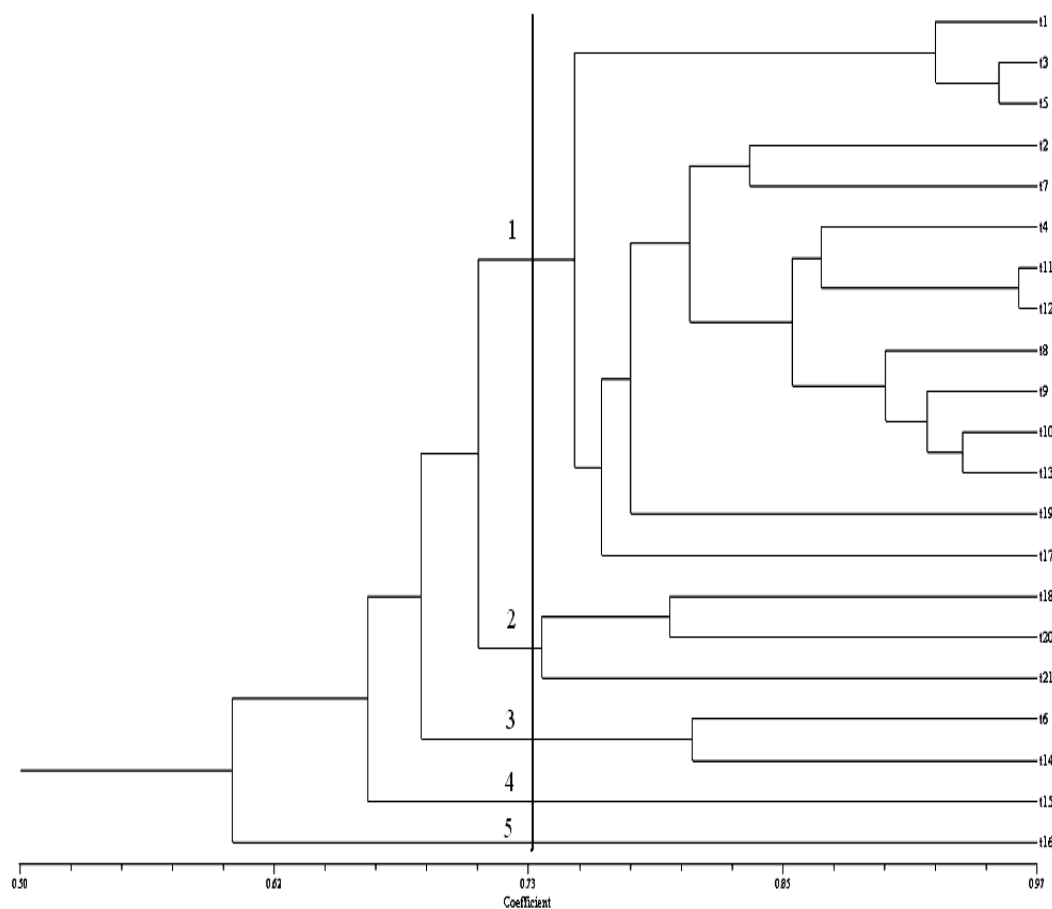


شکل ۳- *Meloidogyne javanica*: A-B: بخش جلویی بدن و دم لارو سن دوم، C: بخش جلویی بدن ماده بالغ، D: شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده بالغ و E: ماده بالغ (اصلی)

Figure 3. *Meloidogyne javanica*: A-B: The front part of the body and tail of the J2s, C: The front part of the body of adult female, D: Perineal pattern of adult female and E: Adult female (Original)

نماتد ریشه گرهی شناسایی شده در مزارع گوجه‌فرنگی استان خراسان شمالی متعلق به گونه *Meloidogyne javanica* می‌باشد. گونه مورد بحث طبق گروه‌بندی (Jepson, 1987) در گروه شش قرار دارد. گونه مذکور از لحاظ شکل شبکه کوتیکولی انتهای بدن بسیار شبیه به گونه *M. cruciani* است ولی گونه *M. cruciani* با داشتن نقاط زیر کوتیکولی در اطراف مخرج و عدم گسترش خطوط سطوح جانبی بدن از گونه *M. javanica* متمایز می‌شود. برای تأیید شناسایی مورفولوژیکی از آغاز گره‌های اختصاصی این گونه که توسط (Zijlstra et al., 2000) و بر اساس روش SCAR طراحی شده‌اند استفاده شد که در تمام جمعیت‌ها تولید باند اختصاصی ۶۷۰ جفت باز را نمود. این امر نشان می‌دهد که شناسایی گونه *M. javanica* بر اساس خصوصیات شبکه کوتیکولی انتهای بدن می‌تواند مفید و کارآمد باشد. بر اساس وجود یا عدم وجود باند، به صورت داده‌های صفر و یک در نرم‌افزار NTSYS_{PC} V-2.02 وارد شد و دندروگرام مربوطه با استفاده از روش UPGMA و ضریب شباهت Dice رسم گردید (شکل ۴). دندروگرام حاصل از داده‌های RAPD در سطح تشابه ۰.۷۳٪ به پنج گروه اصلی تقسیم شد. گروه اول که بزرگ‌ترین گروه تشکیل شده می‌باشد تعدادی از جمعیت‌های مربوط به هر پنج شهر را در خود جای داده است و نشان دهنده این است که این جمعیت‌ها از لحاظ منطقه جغرافیایی به درستی از هم جدا نشده‌اند. هر چند که در این گروه تا حدی بعضی از جمعیت‌های مربوط به

شیروان از بقیه جدا شده‌اند این مسئله را می‌توان به این صورت تفسیر کرد که جریان ژنی بالایی حداقل در جمعیت‌های مربوط به شیروان وجود ندارد. در گروه دوم، سه جمعیت از آشخانه قرار گرفته هر چند که این سه جمعیت به نظر تفکیک شده‌اند، اما سطح تشابه بالایی بین این گروه و گروه اول وجود دارد. در گروه سوم، دو جمعیت از شیروان و بجنورد قرار گرفته‌اند. در گروه چهارم و پنجم فقط یک جمعیت قرار گرفته است که در گروه چهارم یک جمعیت مربوط به آشخانه و در گروه پنجم یک جمعیت مربوط به فاروج قرار گرفته است و می‌توان گفت که این دو گروه به عنوان Out group قرار گرفته‌اند.



شکل ۴- دندروگرام حاصل از نتایج واکنش RAPD در مورد جمعیت‌های مختلف *M. javanica*
Figure 4. Dendrogram of RAPD reaction results in different populations of *M. javanica*

به طور کلی این گونه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که جمعیت‌های انتخاب شده از لحاظ منطقه جغرافیایی نسبتاً از هم فاصله دارند و این جمعیت‌ها بر اساس منطقه جغرافیایی به خوبی از هم تفکیک نشده‌اند و تنوع ژنتیکی کمی بین نمونه‌ها وجود دارد. فقط برخی از جمعیت‌های مربوط به شیروان و تعدادی از جمعیت‌های مربوط به آشخانه در کنار هم قرار

گرفته‌اند و جمعیت‌های مربوط به سایر شهرها از هم فاصله دارند این امر نشان می‌دهد که جریان ژنی نسبتاً بالایی در جمعیت‌های دو شهر شیروان و آشخانه وجود دارد. همچنین جمعیت‌های مربوط به دو شهر فاروج و شیروان از هم بسیار دور افتاده‌اند، با وجود نزدیکی جغرافیایی این دو شهر، تنوع ژنتیکی بالایی بین نمونه‌ها مشاهده گردید که نشانه تفاوت در منشأ نماتدهای مورد بررسی می‌باشد. همچنین RAPD نتوانست جمعیت‌های مختلف گونه *M. javanica* را بر اساس مناطق جغرافیایی تفکیک کند، که این نتیجه با نتایج آدام و همکاران (Adam et al., 2005) همخوانی دارد.

منابع

- Adam, M. A. M., Phillips, M. A., and Blok, V. C. 2005. Identification of *Meloidogyne spp.* from North East Libya and comparison of their inter and intra-specific genetic variation using RAPDs. *Nematology*, 7(4): 599-609.
- Ahmadi, A. R., Tanha Maafi, Z. 2012. Distribution and infection severity of the root-knot nematodes in vegetable fields of Khuzestan province. *Proc. 20th Iran. Plant Protec. Cong.*, Shiraz, Iran, 653. (Abst). (In Persian).
- Askarian, H., Olia, M., Sharifnabi, B. and Mahdikhani Moghadam, E. 2006. Species identification and genetic diversity of *Meloidogyne javanica* on pistachio in Kerman province, Iran. *Japanese Journal of Nematology*, 36(2): 112 (Abst).
- Askarian, H., Sharifnabi, B., Olia, M., Mahdikhani Moghadam, E. and Akhavan, A. 2009. Identification of *Meloidogyne javanica* using morphological and morphometrical characteristics and species specific primers in Kerman province. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 48: 279-290. (In Persian).
- Anonymous. 2011. Agricultural Statistics. Publications of the Ministry of Agriculture.
- Barooti, S. 1997. Plant soil nematodes of East Azarbaijan, Ardabil and Moghan. *Iranian Applied Entomology and Phytopathology*. 66(1,2): 79-98. (In Persian).
- Cenis, J. L. 1993. Identification of four major *Meloidogyne spp.* By Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD-PCR). *Phytopathology*, 83: 76-78.
- Davarian, T., Pourjam, A. 2008. Identification of plant parasitic nematodes vegetable fields in Golestan province. *Proc. 18th Iran. Plant Protec. Cong.*, Hamadan, Iran, 560. (Abst). (In Persian).
- Devran, Z. 2003. The screening of F2 plants for root-knot nematode resistance gene, Mi by PCR in tomato. *Turk J Agric* 28: 253-257.
- Dong, K., Dean, R. A., Fortnum, B. A., Lewis, S. A. 2001. Development of PCR primer to identify species of root knot nematodes: *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* and *M. javanica*. *Nematologica* 31:273-282.

- Fargette M., Mcnicol J.W., Philips M.S. and Blok V.C. 1997. Genetic variation in tropical *Meloidogyne spp.* as shown by RAPD. *Fundamental and Applied Nematology*, 20(2): 127-133.
- Fourie, H., Zijlstra, C. and McDonald, A. 2001. Identification of root-knot nematode species occurring in South Africa using the SCAR-PCR technique. *Nematology* 3(7): 675-680.
- Hewlett. T. E. and Tarjan, A. C. 1983. Monographs-Monografias synopsis of genus *Meloidogyne* Goeldi. *Nematropica*, 13(1): 79-102.
- Jepson, S. B., 1987. Identification of Root Knot Nematodes (*Meloidogyne* species), Wallingford, UK, *CAB international*, 256pp.
- Karkhaneh, R., Hojat jalali, A. A., Sheikholeslami, M., and Asadi sardari, A. 2012. Study on contamination of cucumber and tomato greenhouses of Kermanshah province to root- knot nematodes (*Meloidogyne spp.*). *Proc. 20th Iran. Plant Protec. Cong.*, Shiraz, Iran, 635. (Abst). (In Persian).
- Mahdikhani Moghadam, E., Kheiri, A., Mohammadi, M., Eshtiaghi, H., and Okhovat, M. 2003. Introduced three new species of the genus *Meloidogyne* for Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*. 39(3,4): 189-212 (In Persian).
- Mahdikhani Moghadam, E., Kheiri, A., and Mohammadi, M. 2006. Molecular comparison of populations of *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita* in PCR-RFLP method. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 10(4): 405-410 (In Persian).
- Noori, A. 1995. Identification of plant parasitic nematodes (Tylenchida) vegetable fields in Karaj area. M.SC. Thesis. College of Agriculture, Tehran University, Tehran, Iran.
- Pakniat, M. 2006. The root knot nematode species in a number of fields and greenhouses in the Fars province. *Proc. 17th Iran. Plant Protec. Cong.*, Karaj, Iran, 485. (Abst). (In Persian).
- Powers, T.O.[and Harris. T. S. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *Nematology*, 25(1): 1-6.
- Rafiei, H. R., Mahdikhani Moghadam, E. and Najafinia, M. 2010. *Meloidogyne cruciani* species isolated from cucumber greenhouses of Jiroft and intraspecific genetic diversity using RAPD-PCR. *Journal of plant protection*, 24(1): 43-52. (In Persian).
- Salahi Ardakani, A. 2010. Distribution and identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne spp.*) in the greenhouses and cultivated fields of tomatoes in Kohgilouyeh va Boyer Ahmad province. *Proc. 19th Iran. Plant Protec. Cong.*, Tehran, Iran, 586. (Abst). (In Persian).
- Seinhorst, J. W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4: 67-69.

- Sikora, R. A., and Fernandez, E. 2005. Nematode parasites of vegetables. In: Plant parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. Luc M, Sikora R. A, Bridge J (Editors) 2nd Edition, CABI Wallingford, UK. PP 319-392.
- Sirca S., Urek G. and Karssen G. 2000. The incidence of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla* in slovene. *Acta agriculturerae slovenica*, 83(1): 15-22.
- Tesarova B., Zouhar M. and Rysanek P. 2003. Development of PCR for specific determination of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Protection Science*, 39(1): 23-28.
- Zijlstra, C., Donkers-Venne, D.T.H.M. and Fargette, M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2: 847-853.