شناسایی گونه *Meloidogyne javanica* با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی و آغازگرهای اختصاصی گونه در استان کرمان

هما عسکریان[1*]، بهرام شریف‌نبی[1]، مجید اولیاء[2]، عصمت مهدیخانی مقدم[3] و علیرضا اخوان[1]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۴/۲۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۱۰/۲۸)

چکیده

به‌منظور شناسایی سریع گونه *M. javanica* که در ایران از نظر پراکندگی و فراوانی در درجه اول اهمیت قرار دارد، ۱۰۰ نمونه خاک و ریشه آلوده به نماتود مولد غده ریشه از نقاط مختلف پسته‌کاری استان کرمان و مزارع داوران(رفسنجان) جمع‌آوری گردید. پس از خالص‌سازی و شناسایی گونه *M. javanica* بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی ماده‌های بالغ و لارو سن دوم، DNA ژنومی کلیه جمعیت‌ها از مرحله تخم، لارو سن دوم و ماده‌های بالغ نماتود، استخراج شد. DNA استخراج شده با کمک جفت آغازگرهای اختصاصی گونه OPAFjav / OPARjav و Mjavf / Mjavr تکثیر شد. در کلیه جمعیت‌های گونه *M. javanica* یک قطعه ۶۷۰ جفت‌بازی توسط جفت آغازگر OPAFjav / OPARjav و یک قطعه ۱۶۰۰ جفت‌بازی توسط جفت آغازگر Mjavf / Mjavr تکثیر شد، این قطعات در گونه *M. incognita*، *M. arenaria* و آب که به‌عنوان کنترل منفی در آزمایش گنجانده شده بودند تکثیر نشد. لذا به‌نظر می‌رسد کاربرد این جفت آغازگرها در قیاس با خصوصیات ریخت‌شناسی به تشخیص سریع‌تر گونه *M. javanica* منجر شود.

واژه‌های کلیدی: نماتود مولد غده ریشه، *Meloidogyne javanica*، آغازگرهای اختصاصی گونه، ریخت‌شناسی، ریخت‌سنجی

مقدمه

نماتود مولد غده ریشه (*Meloidogyne* spp.) انگل اجباری بیش از ۲۰۰۰ گونه گیاهی از محصولات زراعی، باغی، صیفی و علف‌های هرز و یکی از بزرگ‌ترین گروه نماتودهای انگل گیاهی از نظر اقتصادی می‌باشد که بیش از ۸۰ گونه آن تا کنون شرح داده شده است. انتشار گسترده، دامنه میزبانی وسیع، تعداد زیاد گونه، توانایی زیاد بیماری‌زایی و برهم‌کنش با دیگر عوامل بیماری‌زای گیاهی، آنها را در ردیف بالای انگل‌های گیاهی مؤثر در زنجیره غذایی جهانی قرار داده است (۱۳ و ۱۴). گونه‌های *M. incognita*، *M. javanica*، *M. arenaria* و *M. hapla* از لحاظ اقتصادی بسیار مهم هستند و در گستره پهناور جغرافیایی قرار گرفته و دارای دامنه میزبانی وسیعی هستند. این چهار گونه ۹۵ درصد از نماتودهای مولد غده ریشه دیده شده در خاک‌های کشاورزی را تشکیل می‌دهند و بیش از ۹۰ درصد

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و کارشناس ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۲. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
۳. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: homaaskarian@yahoo.com

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-30]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1388.13.47.56.9]

خسارت وارده به گیاهان در جهان در اثر نماتود مولد غده ریشه مربوط به این چهار گونه عمده است (۱۵).

کنترل نماتودها بستگی به شناسایی دقیق گونه‌ها و نژادهای آنها دارد و در بسیاری از موارد تعیین جمعیت نماتودها قبل از کاشت امری ضروری است. علاوه بر این، شناسایی نماتودهای انگل گیاهی در سطح گونه و نژاد برای خدمات قرنطینه‌ای و مشاوره‌ای امری اساسی است. شناسایی گونه‌های نماتود مولد غده ریشه بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی، آزمون میزبان‌های افتراقی، الکتروفورز آیزوزایم‌ها و استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌باشد (۱۷ و ۲۱). شاخص‌های ریخت‌شناسی هنوز به‌عنوان یک پشتیبان عمده و حامی اصلی شناسایی در نماتودها هستند. شناسایی نماتودهای مولد غده ریشه به روش ریخت‌شناسی، مشکل، وقت‌گیر و نیازمند مهارت و توانایی زیاد است. شناسایی مراحل قبل از بلوغ نماتودهای مولد غده به‌علت اندازه کوچک‌شان بسیار مشکل است ولی تشخیص و شناسایی آنها بسیار مهم می‌باشد زیرا این مرحله از زندگی نماتود، مرحله آلوده‌کننده گیاهان است، اما شناسایی گونه بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی لاروها به تنهایی ممکن نیست و می‌باید خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی افراد نر و ماده نیز در نظر گرفته شود (۱۱، ۱۳ و ۱۸).

آزمون میزبان‌های افتراقی تنها یک سری مشخصات اولیه برای شناسایی گونه‌های نماتود ارائه می‌دهد و بدون تأیید مشخصات ریخت‌شناسی، سرولوژیکی و مولکولی قابل اطمینان نیست و تنها چهار گونه *M. incognita*، *M. hapla*، *M. arenaria* و *M. javanica* را از هم تفکیک می‌کند و برای جمعیت‌های مرکب از چند گونه قابل اجراست (۶).

مطالعات بیوشیمیایی پروتئین‌های محلول و آنزیم‌ها در سال‌های اخیر موجب شد تا روش‌های عملی برای تفکیک تعدادی از گونه‌های جنس *Meloidogyne* ابداع گردد (۸). آیزوزایم‌ها و پروتئین‌ها نسبت به نشانگرهای ریخت‌شناسی مزایای بیشتری دارند، زیرا پروتئین‌ها محصولات مستقیم ژن‌ها بوده و بنابراین مطالعه آنها خارج از پیچیدگی‌های روابط آللی و آثار پوشانندگی ژن‌ها روی یکدیگر است. در مورد آیزوزایم‌ها سیستم‌های رنگ‌آمیزی متعددی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد بنابراین می‌توان لوکوس‌های ژنتیکی کد کننده آنزیم‌های بسیاری از چرخه‌های متابولیکی را مقایسه کرد و این مزیتی است که به ما اجازه می‌دهد تا اختلافات ژنتیکی درون گونه‌ای را مورد مطالعه قرار دهیم. از معایب تجزیه وتحلیل آیزوزایمی در مقایسه با روش‌های مولکولی نیاز به مقادیر نسبتاً فراوانی از موجود زنده است تا آنزیم کافی برای ردیابی، استخراج گردد. هم‌چنین این روش وقت‌گیر بوده و تأثیر شرایط محیطی و نیز ضرورت انتخاب مرحله خاصی از چرخه زندگی نماتود از معایب دیگر این روش است (۷ و ۸).

از آنجایی که شناسایی گونه و نژادهای نماتود مولد غده ریشه از طریق ریخت‌شناسی و آیزوزایمی وقت‌گیر بوده در دهه‌های اخیر استفاده از مشخصات مولکولی و تجزیه و تحلیل DNA در تشخیص گونه و نژادهای نماتود در حال افزایش است, پیشرفت‌هایی که در این زمینه صورت گرفته، باعث شده که این روش‌ها به‌عنوان روش‌های اختصاصی، سریع و مناسب در تشخیص نماتودهای انگل گیاهی استفاده شوند (۲۱). در نماتود مولد غده ریشه DNA کروموزومی، DNA میتوکندریایی وDNA ریبوزومی به‌علت تفاوت‌های موجود در تعداد نسخه در سلول، سرعت تکامل سلولی و موقعیت توالی‌ها، به‌عنوان ابزاری برای شناسایی مولکولی این نماتودها به‌کار برده می‌شوند (۱۵).

در سال ۱۹۹۳ با به‌کارگیری جفت آغازگر C2F3و۱۱۰۸ که بر اساس توالی ژن کد کننده سیتوکروم اکسیداز (Cytochrome oxidase) در نماتودهای مولد غده ریشه طراحی شده بود، پنج گونه *M. hapla*، *M. arenaria*، *M. chitwoodi*، *M. javanica* و *M. incognita* از یکدیگر متمایز شدند (۱۹). در ایران نیز در سال ۱۳۸۵ با استفاده از آغازگرهای اختصاصیC2F3 و ۱۱۰۸ جمعیت‌های مختلف دو گونه *M. javanica* و *M. incognita* از

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-30]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1388.13.47.56.9]

یکدیگر تفکیک شدند (۱).

در سال ۲۰۰۰ برای تعیین ترادف‌هایی مشخص از DNA هر گونه و تولید آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی گونه‌های *M. incognita*، *M. javanica* و *M. arenaria* از نشانگر PCR-RAPD استفاده شد. با ۱۲ جفت آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی، DNA جمعیت‌های مختلف این سه گونه مورد بررسی قرار گرفت. از بین این ۱۲ جفت آغازگر، سه جفت آغازگرOPA-12، OPB-06 و OPB-01 به‌ترتیب به گونه‌های *M. arenaria*، *M. incognita* و *M. javanica* اختصاص داشته و آنها را به خوبی شناسایی و تفکیک کرده است. تولیدات تکثیری این آغازگرها در مورد گونه‌های مختلف در یک یا دو نوار مشترک بودند. پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعات DNA، آغازگرهای ۱۸ تا ۲۳ نوکلئوتیدی طراحی شد تا توالی نوکلئوتیدی انتهای قطعه DNA را تکمیل کند. این آغازگرهای اختصاصی SCAR-Primer (Sequence characterized amplified region) نامیده می‌شوند. اندازه آنها بلندتر از آغازگرهای RAPD بوده و اختصاصی‌تر عمل می‌کنند. این آغازگرها حساسیت کمتری نسبت به آغازگرهای RAPD به تغییر شرایط واکنش دارند و می‌توانند DNA استخراج شده از توده تخم، لارو سن دوم و ماده‌های بالغ را تکثیر نمایند. بنابراین، این روش به سن و مرحله رشدی نماتود بستگی ندارد و می‌تواند برای شناسایی این سه گونه به‌صورت سریع، قابل اعتماد و همیشگی استفاده شود (۱۰ و ۲۳).

در سال ۲۰۰۱ برای تولید و توسعه آغازگرهای اختصاصی، برای شناسایی گونه‌های *M. arenaria*، *M. incognita*، *M. javanica* و *M. hapla* نشانگر PCR-RAPD به‌کار برده شد. ۲۶ جمعیت مختلف از کشورهای اروپایی و آفریقایی جمع‌آوری و بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و فنوتیپ‌های آنزیمی، گونه‌ها شناسایی شدند. با انجام PCR-RAPD توسط ۱۲۰ آغازگر، چندشکلی به‌دست آمده بین این جمعیت‌ها بررسی شد. باندهای تخصصی برای هر گونه همسانه‌سازی و تعیین ترادف شد و بر اساس این توالی‌ها آغازگر اختصاصی گونه غربال گردید. این آغازگرها در واکنش PCR تولید باند اختصاصی ۱۵۰۰ جفت‌باز در *M. hapla*، ۹۵۰ جفت‌باز در *M. arenaria*، ۱۳۵۰ جفت‌باز در *M. incognita*، ۱۶۰۰ جفت‌باز در *M. javanica* کردند. این آغازگرها روی جمعیت‌های دیگر مناطق جغرافیایی مثل آمریکای شمالی نیز آزمایش شد و نتایج مشابهی را در برداشت. بنابراین این چهار جفت آغازگر برای شناسایی قطعی چهار گونه عمده نماتود مولد غده ریشه در کتابخانه نماتودشناسی معرفی گردیدند (۲). پژوهش‌های انجام شده در زمینه شناسایی مناطق آلوده ایران حکایت از آلودگی وسیع مناطق مختلف به نماتود مولد غده ریشه به‌خصوص گونه *M. javanica* است. شناسایی دقیق گونه‌ها و نژادهای هر گونه، اولین قدم در راه تامین اطلاعات لازم برای تعریف هر نوع سیستم مدیریت تلفیقی برای مهار این بیماری مهم اقتصادی است. لذا هدف از انجام این پژوهش شناسایی گونه *M. javanica* با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی و امکان استفاده از آغازگرهای اختصاصی در ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در سال ۱۳۸۳ طی مسافرت‌هایی که به مناطق مختلف پسته‌کاری استان کرمان و مزارع سبزی و صیفی داوران رفسنجان صورت گرفت، تعداد ۱۰۰ نمونه خاک و ریشه آلوده به نماتود مولد غده ریشه جمع‌آوری گردید (جدول ۱). برای به‌دست آوردن یک جمعیت خالص از هر نمونه، یک کیسه تخم بزرگ انتخاب گردید و با پنس سترون به آرامی از ریشه جدا و مجاور یک نشاء گوجه فرنگی رقم Cormello قرار گرفت. بعد از گذشت ۷۰-۶۰ روز ریشه‌ها ازگلدان خارج و برای نمونه‌برداری به‌منظور شناسایی و تکثیر مجدد نماتودها آماده شدند.

به‌منظور شناسایی گونه *M. javanica* با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی، پس از خالص سازی، قطعاتی از ریشه‌های جوان حاوی غده را در آب نمک ۰/۹٪ قرار داده و با استفاده از سوزن نوک تیز و پنس ماده‌ها

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-30]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1388.13.47.56.9]

جدول ۱. فهرست مکان و تعداد نمونه‌برداری، میزبان، گونه نماتود مورد مطالعه و کد مولکولی

محل نمونه برداری	میزبان	تعداد نمونه	گونه نماتود	کد مولکولی
رفسنجان (فیض آباد)	پسته (فندقی)	۴	*M. javanica*	J1- J4
رفسنجان (انار، هرمزآباد)	پسته (اکبری، کله قوچی)	۵	*M. javanica*	J5- J9
رفسنجان (انار، صدرآباد)	پسته (کله قوچی)	۲	*M. javanica*	J10 & J11
رفسنجان (انار، سرزیر)	پسته (اکبری، کله قوچی)	۳	*M. javanica*	J12- J14
رفسنجان (انار، بهاآباد)	پسته (کله قوچی)	۲	*M. javanica*	J15 & J16
رفسنجان(نوق، اسماعیل‌آباد)	پسته (احمد آقایی، کله قوچی، بادامی)	۱۰	*M. javanica*	J17- J26
رفسنجان (خنامان، قنات علی‌آباد)	پسته (فندقی)	۶	*M. javanica*	J27- J32
رفسنجان (خنامان، چاه گز)	پسته (فندقی)	۴	*M. javanica*	J33- J36
رفسنجان (کبوترخان، آزادی)	پسته (فندقی)	۳	*M. javanica*	J37- J39
رفسنجان (کبوترخان، طالق آباد)	پسته (فندقی)	۱	*M. javanica*	J40
رفسنجان (کبوترخان، صبوری)	پسته (فندقی)	۲	*M. javanica*	J41 & J42
رفسنجان (ده شیخ)	پسته (کله قوچی، فندقی)	۳	*M. javanica*	J43- JJ45
رفسنجان(همت‌آباد، حجت‌آباد)	پسته (کله قوچی)	۲	*M. javanica*	J46 & J47
رفسنجان (همت‌آباد، رضائیه)	پسته (کله قوچی، اکبری)	۳	*M. javanica*	J48- J50
رفسنجان (مرکز تحقیقات پسته کشور)	پسته (فندقی)	۲	*M. javanica*	J51 & J52
کرمان (باغین، قندآباد)	پسته (فندقی)	۳	*M. javanica*	J53- J55
کرمان(زرند، محمود زکایی)	پسته (فندقی)	۵	*M. javanica*	J56- J60
کرمان(زرند، تاج‌آباد)	پسته (فندقی)	۵	*M. javanica*	J61- J65
کرمان(زرند، دریانی)	پسته (فندقی)	۲	*M. javanica*	J66 & J67
کرمان(زرند، فاز شیخ‌ها)	پسته (فندقی)	۱	*M. javanica*	J68
کرمان (بردسیر، نصرآباد ۲)	پسته (کله قوچی، اکبری)	۲	*M. javanica*	J69 & J70
کرمان (بردسیر، روستای هجین)	پسته (اکبری)	۲	*M. javanica*	J71 & J72
سیرجان (شهربابک، ۱۰۱)	پسته (فندقی)	۲	*M. javanica*	J73 & J74
سیرجان (شهربابک، ۲۲ بهمن)	پسته (کله قوچی)	۳	*M. javanica*	J75- J77
سیرجان (دوچاهی)	پسته (کله قوچی، اکبری، فندقی)	۵	*M. javanica*	J78- J82
رفسنجان (داوران)	گوجه‌فرنگی	۳	*M. javanica*	J83- J85
رفسنجان (داوران)	بادمجان	۳	*M. javanica*	J88– J86
رفسنجان (داوران)	خیار	۳	*M. javanica*	J89- J91
رفسنجان	پسته (فندقی، کله قوچی، بادامی)	۴	*M. incognita*	IN1-IN4
سیرجان(دوچاهی)	پسته (فندقی)	۱	*M. incognita*	IN5
رفسنجان	پسته (فندقی، کله قوچی، بادامی)	۴	*M. arenaria*	AR1-AR4

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-30]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1388.13.47.56.9]

خارج و به اسید لاکتیک ۴۵٪ منتقل و برش‌های شفاف از انتهای بدن و ناحیه سر و گردن تهیه و به گلیسرین خالص منتقل شد هم‌چنین کیسه تخم مربوط به هر نماتود ماده‌ای که از آنها برش تهیه شد در آب مقطر سترون درون پتری قرار گرفت. پس از مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۲۸°C تخم‌ها تفریخ شدند سپس کشتن و تثبیت کردن لاروهای سن دوم به روش دگریس (۲) انجام گرفت و اسلاید دایم تهیه شد. تعداد افراد اندازه‌گیری شده برای تشخیص گونه به فراوانی نماتودهای جمع‌آوری شده بستگی داشته و متفاوت بود. به‌طور کلی در ماده‌ها ۲۰ تا ۲۵ فرد و لارو سن دوم ۲۵ تا ۳۰ فرد برای تشخیص گونه اندازه-گیری شدند.

جهت استخراج DNA و شناسایی گونه *M. javanica* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، چندین روش مورد استفاده قرار گرفت و در نهایت استخراج DNA به روش سیلوا و همکاران (۲۰) با کمی تغییرات به شرح زیر انجام گرفت: ابتدا ۵۰-۳۰ میکرولیتر نماتود ماده بالغ، لارو سن دوم، تخم و یا مخلوط تخم و لارو سن دوم معلق در آب مقطر دو بار سترون، درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه رسوب داده شد. لوله‌های حاوی نماتود در نیتروژن مایع قرار گرفت سپس نمونه به هاون کوچک منتقل و کاملا در حضور نیتروژن مایع ساییده شد. ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۱۰۰mM Tris-HCl pH۸، ۱/۴M NaCl، ۲۰ mM EDTA، ۳٪ CTAB و ۱٪ β-mercaptoethanol) اضافه شد. نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۵ °C و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰ °C نگه‌داری شدند. در مرحله بعد در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند و فاز رویی به لوله جدید منتقل گردید. سپس هم حجم آن، مخلوط کلروفرم-ایزوآمیل الکل(۲۴:۱) اضافه و پس از یک تکان شدید و مخلوط شدن کامل به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از اتمام این مرحله فاز رویی به لوله جدید منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد و به‌مدت ده دقیقه در ۲۰°C- قرار گرفت و پس از آن به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شد. رسوب حاصل پس از شستشو با اتانول ۷۰٪ و سانتریفوژ مجدد در دمای محیط خشک و سپس در ۳۰-۲۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار سترون حل گردید. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از جمعیت‌های مختلف از الکتروفورز ژل آگارز و روش اسپکتروفوتومتری استفاده گردید. در این تحقیق دو جفت آغازگر اختصاصی OPAFjav/ OPARjav (۲۳) و Mjavr / Mjavf (۳) برای شناسایی گونه *M. javanica* مورد استفاده قرار گرفت. این دو جفت آغازگر بر پایه روش SCAR با توجه به آنالیز PCR-RAPD معرفی شده و دارای توانایی ردیابی اختصاصی گونه *M. javanica* می‌باشند. این آغازگرها توسط شرکت آلمانی TIB-Molbiol تهیه شده و توالی آنها در جدول ۲ ذکر شده است. در واکنش PCR برای جلوگیری از خطاهای احتمالی در هنگام برداشتن مقادیر کم مواد و نیز برای راحتی و سرعت عمل بیشتر، اقدام به تهیه محلول پایه (Stock solution) گردید. به‌دلیل استفاده از بیش از یک آغازگر، شرایط چرخه‌های حرارتی هر آغازگر جداگانه تنظیم شد که بسته به مورد آزمایش از آنها استفاده گردید. دمای ۴ °C پس از مرحله گسترش نهایی به‌عنوان چرخه پایانی در تمام برنامه‌ها تنظیم شد، این دما برای حفظ محصول PCR اهمیت دارد. واکنش PCR برای جفت آغازگر اختصاصی OPAFjav /OPARjav در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۰/۲ میلی‌مولار از هر $dNTP_S$، ۰/۲۴ میکرومولار از هر یک از آغازگرها، *Taq* DNA Polymerase۱/۵Unit/µl و ۲ میکرولیتر DNA الگو (۲۵ ng/µl) با برنامه حرارتی شامل یک مرحله دو دقیقه‌ای در ۹۴ °C و سپس ۳۵ چرخه ۹۴ °C برای ۳۰ ثانیه، ۶۴ °C برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C برای یک دقیقه انجام گرفت. در پایان یک مرحله گسترش نهایی در ۷۲ °C برای پنج دقیقه در نظر گرفته شد. واکنش PCR برای جفت آغازگر اختصاصی Mjavf / Mjavr نیز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR(۱۰X)، ۰/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار از هر $dNTP_S$، ۰/۲۴ میکرومولار از هر یک از آغازگرها،

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-30]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1388.13.47.56.9]

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای اختصاصی گونه *M. javanica*

طول قطعه(bp)	توالی نوکلئوتیدی	نام آغازگر
۶۷۰	5'-ggTgCgCgATTgAACTgAgC-3'	OPAFjav
	5'-CAggCCCTTCAgTggAACTATAC-3'	OPARjav
۱۶۰۰	5'-CCTTAATgTCAACACTAgAgCC-3'	Mjavf
	5'-ggCCTTAACCgACAATTAgA-3'	Mjavr

Taq DNA Polymerase۱/۵Unit/µl و ۲ میکرولیتر DNA الگو (۲۵ ng/µl) با برنامه حرارتی شامل یک مرحله دو دقیقه‌ای در ۹۴ °C و سپس ۳۵ چرخه ۹۴ °C برای ۳۰ ثانیه، ۵۸ °C برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C برای یک دقیقه و در پایان یک مرحله گسترش نهایی در ۷۲ °C برای پنج دقیقه انجام گرفت. برای جلوگیری از تبخیر مواد یک قطره روغن معدنی سترون (Mineral Oil) به هر لوله اضافه شد و سپس لوله‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Genius FGEN 05 TD) قرار گرفتند. پس ازاتمام واکنش PCR، ۵µl از محصول PCR با دو میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۲٪ در بافر TBE (Tris Borate EDTA) بارگیری شد و نشانگر λ (Roche MIII *Hind*III-*Eco*RI) نیز در اولین چاهک ژل به‌طور جداگانه برای تخمین اندازه قطعات تولیدی استفاده گردید

نتایج و بحث

گونه *M. javanica* با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی ماده‌های بالغ و لارو سن دوم بر اساس منابع موجود شناسایی شد (۴، ۵، ۶، ۱۲ و ۱۶). بدن ماده‌ها نسبتاً گرد، گردن مشخص، شیری رنگ، انتهای بدن همسطح با بقیه بدن و یا کمی برجسته، سر همطراز با بدن با کلاهک مشخص، سر دارای یک شیار عرضی پس از کلاهک سر، شبکه کوتیکولی با رشد متوسط، استایلت باریک و قسمت مخروطی ۵۰/۶٪ طول کل آن و به‌طرف پشتی خمیده می‌باشد (جدول ۳). شبکه کوتیکولی انتهای بدن گرد تا بیضی شکل، کمان پشتی گرد و پهن تا کمی بلند و گاهی تخت و پخ، شیارها صاف تا کمی موج دار، ممتد یا شکسته، انتهای دم غالبا مشخص و خطوط سطوح جانبی بدن به‌طور مشخص شبکه کوتیکولی انتهای بدن را به دو قسمت پشتی و شکمی تقسیم می کنند و فازمیدها به‌صورت ته سنجاقی در بین خطوط سطوح جانبی به فاصله هم عرض فرج و یا کمتر دیده می شوند (شکل ۱). لاروهای سن دوم کرمی شکل با بدنی کوچک و باریک که پس از تثبیت شدن به‌صورت کشیده تا به شکل حرف C باز در می آیند. پوست با شیارهای عرضی ظریف و سطوح جانبی با ۴ شیار طولی، سر همطراز بدن، استایلت باریک به طول ۱۵/۵ تا ۱۸ میکرومتر، گره‌های استایلت گرد و جانبی و قسمت مخروطی کمی بلندتر از قسمت استوانه ای، دم مخروطی شکل و انتهای آن به‌طور ظریفی گرد شده با طول ۴۶ تا ۵۷ میکرومتر وهیالین به طول ۱۱ تا ۱۶ میکرومتر می باشد (جدول ۳).

در این تحقیق به‌منظور انتخاب روش مناسب و مطمئن جهت استخراج DNA، چهار روش: سوین و همکاران (۲۱)، فارگت و همکاران (۹)، دانگ و همکاران (۳) و روش سیلوا و همکاران (۲۰) مورد ارزیابی قرار گرفت. در مقایسه روش‌ها، از آنجایی که عواملی مانند زمان، هزینه و خلوص DNA در تمامی روش‌های مورد استفاده یکسان بود، روش سیلوا و همکاران جهت استحصال DNA از نظر کمیت، مناسب تشخیص داده شد و DNA کلیه جمعیت‌های مورد مطالعه به این روش استخراج گردید. مقدار DNA استخراج شده از ۳۰ µl هر نمونه نماتود ۹۰ تا ۲۰۰ نانوگرم و نسبت اسید نوکلئیک به پروتئین (OD ۲۶۰/۲۸۰) در این روش از ۱/۶ تا ۱/۹ متغیر بود. کمیت و کیفیت DNA به‌دست آمده از لارو سن دوم و تخم نسبت به

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-30]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1388.13.47.56.9]

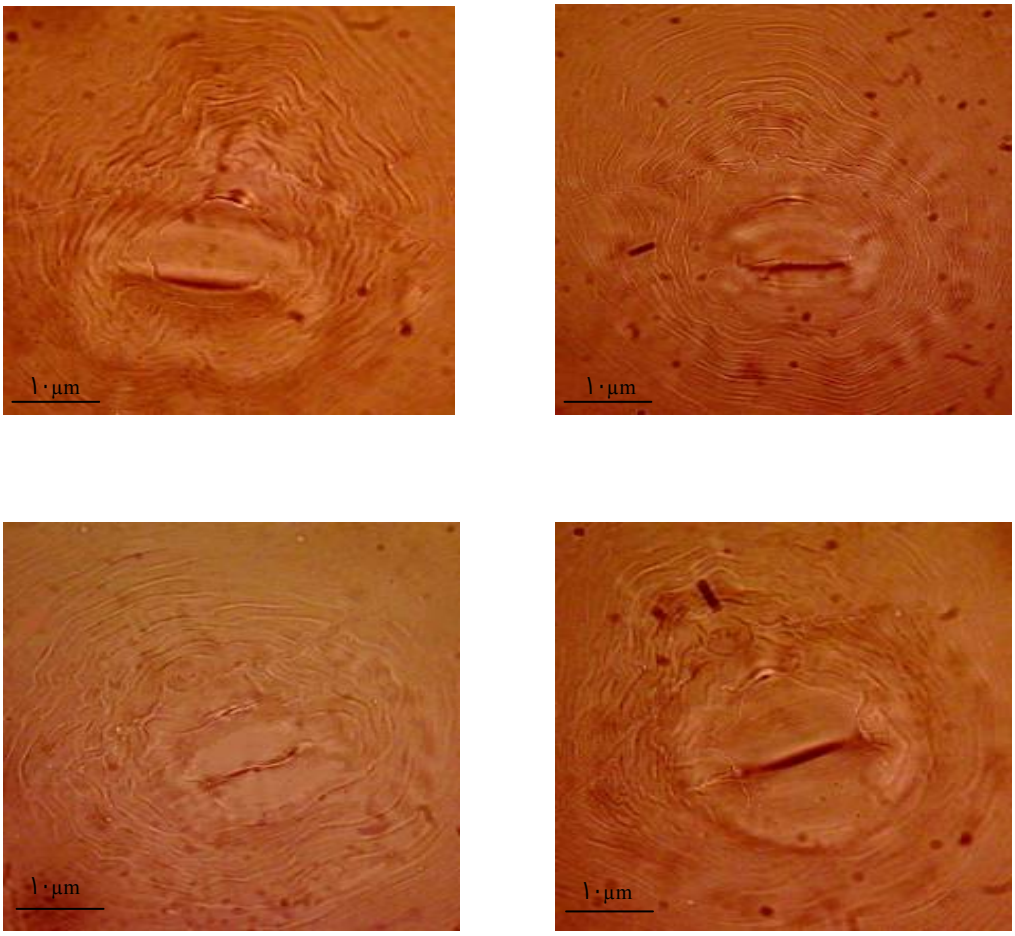
جدول ۳. مشخصات ریخت‌سنجی ماده‌های بالغ و لارو سن دوم گونه *M. javanica*

مشخصات	ماده‌ها (به میکرومتر)	لارهای سن دوم (به میکرومتر)
طول بدن	۶۹۰–۹۶۴ (۸۲۸/۳)	۳۹۵ – ۴۲۰ (۴۱۰/۸)
عرض بدن	۳۵۰–۵۳۰ (۴۶۳)	۹–۱۱ (۱۰/۸)
طول استایلت	۱۵/۵–۱۸ (۱۶)	۱۰/۵–۱۳ (۱۱/۴)
ارتفاع گره استایلت	۲–۳ (۲/۶)	۱–۱/۶ (۱/۴)
عرض گره استایلت	۲–۵ (۴)	۲–۲/۴ (۲/۲)
محل ریزش محتوای غده پشتی	۳–۶ (۴/۶)	۲/۵–۴ (۳/۲)
حد فاصل انتهای بالایی تا روزنه ترشحی	۴۲–۴۷ (۴۵)	-
حد فاصل انتهای بالایی تا مرکز حباب میانی	۹۰–۹۶ (۹۳/۲)	-
طول شکاف فرج	۱۸–۳۰ (۲۵)	-
فاصله فرج تا مخرج	۱۲–۳۲ (۱۷/۵)	-
فاصله بین دو فاز مید	۲۰–۳۰ (۲۵)	-
طول دم	-	۴۶–۵۷ (۵۲/۴)
طول بخش شفاف انتهای دم	-	۱۱–۱۶ (۱۳)
طول بدن/ طول دم	-	۷–۹ (۸/۳)

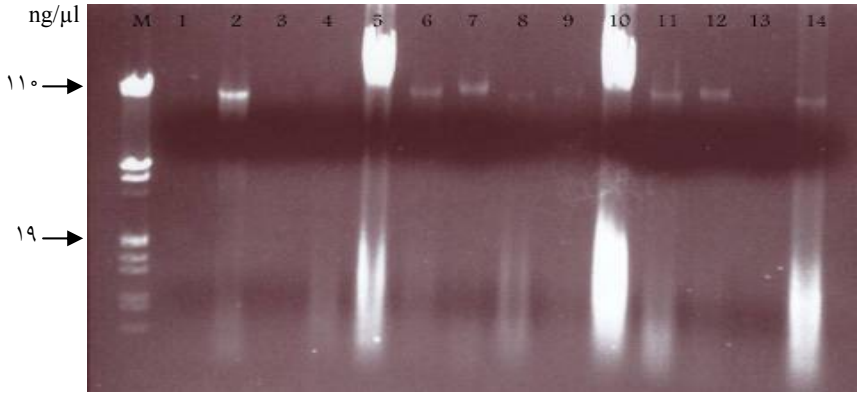
نماتودهای ماده بالغ مطلوب‌تر ارزیابی شد. از آنجایی که دستیابی به لارو سن دوم نیاز به وقت بیشتری داشت، در کلیه نمونه‌ها از تخم نماتود جهت استخراج DNA استفاده گردید (شکل۲). جهت انجام واکنش PCR، غلظت DNA در تمام نمونه‌ها ۲۵ng/µl تنظیم گردید (شکل ۳). در آزمایش‌های انجام شده اولیه هر دو جفت آغازگر، باندهای غیر اختصاصی در بالای باند اصلی تولید کردند اما این باند اضافه در گونه *M. incognita*، *M. arenaria* و آب مقطر که به‌عنوان کنترل منفی در آزمایش گنجانده شده بودند تکثیر نشد. با توجه به این‌که روش‌های استوار بر پایه PCR معمولاً تحت تأثیر عوامل مختلف از جمله DNA الگو، غلظت آغازگر مورد استفاده، دمای اتصال و ترکیب بافر PCR قرار می‌گیرند، بنابراین تغییر مقادیر مواد و تنظیم شرایط واکنش PCR الزامی است. در این تحقیق از عامل تغییر دمای اتصال برای هر دو جفت آغازگر در محدوده دمایی ۶۶ –۴۸ $^{\circ}C$ استفاده گردید و بدین ترتیب مناسب‌ترین دمای اتصال برای جفت آغازگر OPARjav/OPAFjav، ۶۴ $^{\circ}C$ و برای جفت آغازگر Mjavf / Mjavr، ۵۸ $^{\circ}C$ در نظر گرفته شد. هم‌چنین از عامل تغییر میزان $MgCl_2$ نیز برای بهینه‌سازی واکنش PCR

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-30]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1388.13.47.56.9]



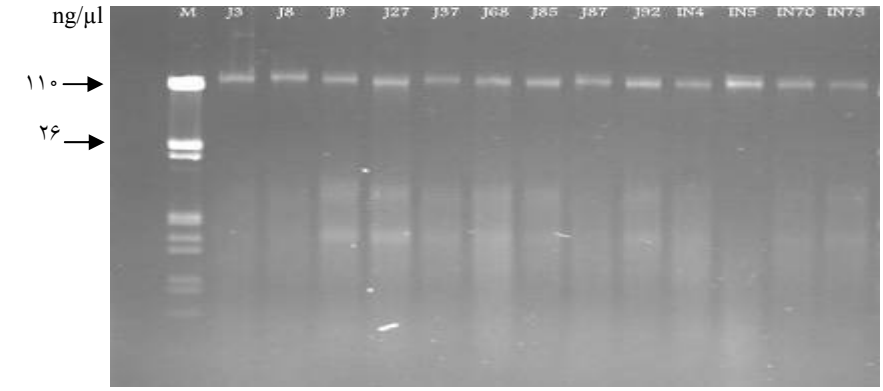
شکل ۱. شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده بالغ گونه *M. javanica*



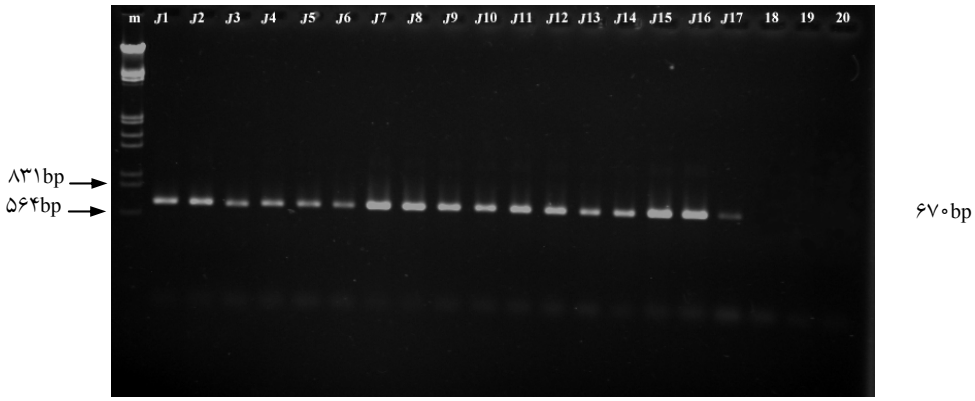
شکل ۲. الکتروفورز DNA استخراج شده با روش‌های: سیلوا و همکاران (۱، ۲، ۳ و ۴ استخراج از ماده بالغ، ۵ استخراج از تخم نماتود، ۱۰ استخراج از لارو سن دوم)، فارگت و همکاران (۶ استخراج از تخم نماتود، ۷ استخراج از لارو سن دوم)، دانگ و همکاران (۸ استخراج از تخم نماتود، ۹ استخراج از لارو سن دوم)، سوین و همکاران (۱۳ استخراج از ماده بالغ، ۱۱ و ۱۲ استخراج از تخم نماتود، ۱۴ استخراج از لارو سن دوم) و M) نشانگر DNA III

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-30]

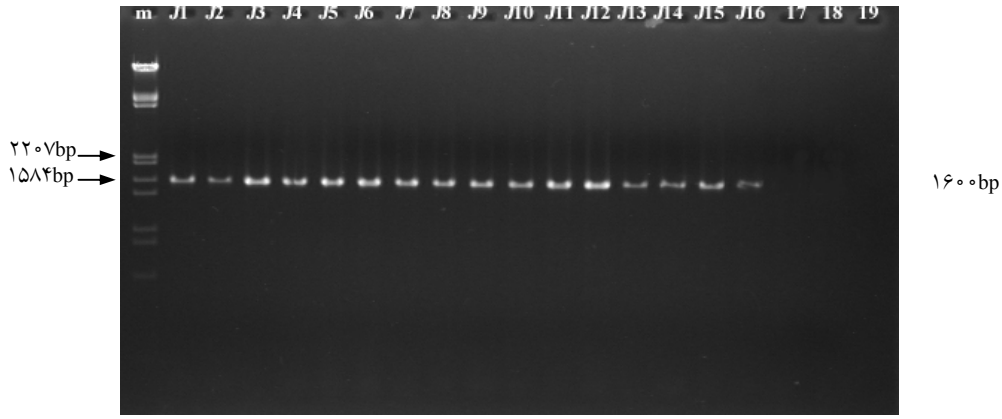
[DOR: 20.1001.1.22518517.1388.13.47.56.9]



شکل ۳. تعیین غلظت DNA استخراج شده با روش سیلوا و همکاران با استفاده از مقدار DNA باندهای نشانگر III DNA
M) نشانگر III DNA J3-J92) جمعیت‌های مختلف گونه *M. javanica* IN4-IN73) جمعیت‌های مختلف گونه *M. incognita*



شکل ۴. تکثیر باند ۶۷۰ جفت بازی توسط جفت آغازگر OPAFjav / OPARjav در جمعیت‌های مختلف گونه M. javanica (J1- J17) نشانگر III DNA (m) گونه *M. incognita* (18) گونه *M. arenaria* (19) آب مقطر(20)



شکل ۵. تکثیر باند ۱۶۰۰ جفت بازی توسط جفت آغازگر Mjavf / Mjavr در جمعیت‌های مختلف گونه M. javanica (J1- J16)
نشانگرIII DNA (m) گونه *M. incognita* (17) گونه *M. arenaria* (18) آب مقطر(19)

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-30]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1388.13.47.56.9]

استفاده شد. غلظت‌های مختلف $MgCl_2$ مورد آزمایش قرار گرفت و مناسب‌ترین غلظت برای جفت آغازگر OPARjav / OPAFjav ۱/۵ میلی‌مولار تعیین گردید. لذا دیگر نیازی به اضافه کردن کلرید منیزیم نبوده و همان کلرید منیزیم موجود در بافر PCR کافی است. میزان مورد نیاز کلرید منیزیم در واکنش‌های مربوط به آغازگر دیگر دو میلی‌مولار تعیین شد. لذا در هر واکنش ۰/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم اضافه گردید تا غلظت مورد نیاز تأمین گردد. این آغازگرها با غلظت کلرید منیزیم و دمای اتصال جدید آزمایش شدند، نتایج حاصل از این آزمایش حاکی از حذف باند غیر اختصاصی بود. جفت آغازگر OPARjav / OPAFjav، یک قطعه ۶۷۰ جفت‌بازی را در کلیه جمعیت‌های گونه *M. javanica* تکثیر نمود (شکل ۴) و این گونه را از گونه *M. incognita* و *M. arenaria* متمایز کرد. نتایج حاصله از این تحقیق با نتایج به‌دست آمده توسط زیلسترا و همکاران مطابقت دارد (۲۳). زیلسترا و همکاران (۲۳) نیز پس از استخراج DNA از توده تخم، لارو سن دوم و ماده‌های بالغ با استفاده از جفت آغازگرOPARjav / OPAFjav و تکثیر قطعه ۶۷۰ جفت‌بازی، گونه *M. javanica* را از دیگر گونه‌ها متمایز نمودند و ثابت کردند که این روش به سن و مرحله رشدی نماتود بستگی ندارد و می‌تواند برای شناسایی سریع، قابل اعتماد و همیشگی این گونه استفاده شود.

جفت آغازگر دیگری که در این تحقیق برای شناسایی گونه *M. javanica* مورد استفاده قرار گرفت آغازگر اختصاصی Mjavf / Mjavr بود که در کلیه جمعیت‌های گونه *M. javanica*، یک قطعه ۱۶۰۰ جفت‌بازی را تکثیر نمود. این قطعه در دو گونه *M. incognita* و *M. arenaria* مشاهده نشد (شکل۵). نتایج حاصل با نتایج به‌دست آمده توسط دانگ و همکاران مطابقت دارد (۳). دانگ و همکاران (۳) ۲۶ جمعیت مختلف نماتود مولد غده ریشه از کشورهای اروپایی و آفریقایی جمع‌آوری و گونه *M. javanica* را بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و فنوتیپ‌های آنزیمی شناسایی کردند. پس از استخراجDNA با انجام واکنش PCR با آغازگر اختصاصی Mjavf / Mjavr، قطعه ۱۶۰۰ جفت‌بازی در جمعیت‌های مختلف *M. javanica* به‌دست آوردند. این آغازگرها روی جمعیت‌های دیگر مناطق جغرافیایی مثل آمریکای شمالی نیز آزمایش گردید و نتایج مشابهی را در برداشت. بنابراین این جفت آغازگر برای شناسایی قطعی گونه *M. javanica* در کتابخانه نماتودشناسی معرفی گردید. لذا می‌توان جهت شناسایی گونه *M. javanica* در ایران در کنار روش‌های ریخت‌شناسی که مشکل، وقت‌گیر و نیازمند مهارت و توانایی زیاد می‌باشد و هم‌چنین روش‌های بیوشیمیایی که وقت‌گیر و تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد و نیازمند مقادیر نسبتاً فراوانی از موجود زنده و مرحله خاصی از چرخه زندگی نماتود هستند از آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق استفاده گردد.

منابع مورد استفاده

۱. مهدیخانی مقدم، ع.، ا. خیری و م. محمدی. ۱۳۸۵. مقایسه مولکولی جمعیت‌هایی از *Meloidogyne javanica* و *Meloidogyne incognita* در ایران با روش PCR-RFLP . مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۱۰: ۴۰۵-۴۱۲.

2. De Grisse, A. T. 1969. Redescription ou modification de quelques techniques utilisées dans Létude des nématodes phytoparasitaires. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent. 34: 351- 369.
3. Dong, K. R. A. Dean, B. A. Fortnum and S. A. Lewis. 2001. Development of PCR primer to identify species of root knot nematodes: *Meloidogyne arinaria, M. hapla , M. incognita* and *M. javanica.* Nematropica 31: 273-282.
4. Eisenback, J. D. 1985. Diagnostic characters useful in the identification of the four common species of root knot nematodes *(Meloidogyne* spp). PP. 95-112. *In*: Sasser, J. N and C. C. Carter (Eds.), An Advanced Treatise on *Meloidogyne*.Vol. I. North Carolina State University Graphics, USA.
5. Eisenback, J. D. 1985. Detailed morphology and anatomy of second-stage juveniles, males and females of the genus Meloidogyne (Root knot nematodes).PP. 47-77. *In*: Sasser, J. N and Carter, C. C (Eds.), An Advanced Treatise on *Meloidogyne*.Vol. I. North Carolina State University Graphics, USA.
6. Eisenback, J. D and Triantaphyllou, H. H. 1991. Root knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. PP. 191-274.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-30]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1388.13.47.56.9]

In: Nickle, W. R (Ed.), Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker Pub., New York, USA.
7. Esbenshade, P. R and A. C. Triantaphyllow. 1985. Use of enzyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. J. Nematol. 17: 6-20.
8. Esbenshade, P. R and A. C. Triantaphyllow. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. J. Nematol. 22: 10-15.
9. Fargette, M., M.S. Phillips, V. C. Blok, R Waugh and D. L. Trudgill. 1996. An RFLP study of relationships between species, populations and resistance-breaking lines of tropical species of *Meloidogyne*. Fundam. Appl. Nematol. 19: 193-200.
10. Fourie, H., C. Zijlstra and A. H. Mcdonald. 2001. Identification of root knot nematode species occurring in South Africa using the SCAR-PCR technique. J. Nematol. 3: 675-680.
11. Harris, T. S., L. J. Sandall and T. O. Powers. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. J. Nematol. 22: 518-524.
12. Hirschmann, H. 1985. The genus Meloidogyne and morphological characters differentiating its species. PP. 79-93. *In*: Sasser, J. N. and C. C. Carter. (Eds.), An advanced treatise on Meloidogyne. Vol. I, North Carolina State University Graphics, Raleigh, USA.
13. Hugall, A., J. Stanton and C. Moritz. 1999. Reticulate evolution and the origins of ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomitic *Meloidogyne*. Mol. Biol. Evol. 16: 157-164.
14. Hussey, R. S. 1990. Biochemical and molecular methods of identifying *Meloidogyne* species : symposium introduction. J. Nematol. 22: 8-9.
15. Hyman, B. C. 1990. Molecular diagnosis of *Meloidogyne* species. J. Nematol. 22: 24-30.
16. Jepson, S. B. 1987. Identification of root knot nematodes *(Meloidogyne* species*)*. C.A.B. International, Wallingford, Oxon, United kingdom.
17. Mitkowski, N. A., J. G. Van der Beek and G. S. Abawi. 2002. Characterization of root knot nematode populations associated with vegetables in New York State. Plant Dis. 86: 840-847.
18. Powers, T. O and L. J. Sandall. 1988. Estimation of genetic divergence in *Meloidogyne* mitochondrial DNA. J. Nematol. 20: 505-511.
19. Powers, T. O and T. S. Sanders. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. J. Nematol. 25: 1-6.
20. Silva, A. T., J. C. V. Penna, L. R. Goulart, M. A. Santos and N. E. Arantes. 2000. Genetic variability among and within races of *Heterodera glycines* ichinohe assessed by RAPD markers. Genet. Mol. Biol. 23: 323-329.
21. Swain, S. C., A. K.Ganguly, P. Sahoo and T. Mohapatra. 1999. RAPD analysis distinguishes four races of root knot nematodes, *Meloidogyne incognita.* Indian J. Nematol. 29: 1-7.
22. Zijlstra, C. 1997. A fast PCR assay to identify *Meloidogyne chitwoodi, M. fallax* and *M. hapla,* and to sensitively differentiate them from each other and from *M. incognita* in mixtures. Fundam. Appl. Nematol. 20: 505-511.
23. Zijlstra, C., D. T. H. M. Donkers-Venne and M. Fargette. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arinaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assays. Nematology 2: 847-853.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-11-30]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1388.13.47.56.9]