

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

هما عسکریان<sup>۱\*</sup>، بهرام شریف‌نبی<sup>۱</sup>، مجید اولیاء<sup>۲</sup>، عصمت مهدیخانی مقدم<sup>۳</sup> و علیرضا اخوان<sup>۱</sup>

(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. arenaria* و *M. incognita* 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

بیماری‌زای گیاهی، آنها را در ردیف بالای انگل‌های گیاهی مؤثر در زنجیره غذایی جهانی قرار داده است (۱۳ و ۱۴). گونه‌های *M. hapla*، *M. arenaria*، *M. javanica* و *M. incognita* 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

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

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

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 آلی و آثار پوشاندگی 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 و تحلیل 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 و DNA 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 C2F3 و ۱۱۰۸ 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 اختصاصی C2F3 و ۱۱۰۸ جمعیت‌های مختلف دو گونه *M. javanica* و *M. incognita* از

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 آغازگر OPA-12، OPB-06 و OPB-01 به ترتیب به گونه‌های *M. incognita*، *M. arenaria* 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 به صورت سریع، قابل اعتماد و همیشگی استفاده شود (۱۰ و ۲۳).

در سال ۲۰۰۱ برای تولید و توسعه آغازگرهای اختصاصی، برای شناسایی گونه‌های *M. incognita*، *M. arenaria*، *M. javanica* و *M. hapla* نشانگر PCR-RAPD به کار 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 به دست 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 به خصوص 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 به دست 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 ۶۰-۷۰ روز ریشه‌ها از گلدان خارج و برای نمونه‌برداری به منظور شناسایی و تکثیر مجدد نماتودها آماده شدند.

به منظور 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 ۹٪ قرار داده و با استفاده از سوزن نوک تیز و پنس ماده‌ها

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

| کد مولکولی | گونه نماتود         | تعداد نمونه | میزبان                              | محل نمونه برداری                 |
|------------|---------------------|-------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| J1- J4     | <i>M. javanica</i>  | ۴           | پسته (فندقی)                        | رفسنجان (فیض آباد)               |
| J5- J9     | <i>M. javanica</i>  | ۵           | پسته (اکبری، کله قوچی)              | رفسنجان (انار، هرمزآباد)         |
| J10 & J11  | <i>M. javanica</i>  | ۲           | پسته (کله قوچی)                     | رفسنجان (انار، صدرآباد)          |
| J12- J14   | <i>M. javanica</i>  | ۳           | پسته (اکبری، کله قوچی)              | رفسنجان (انار، سرزیر)            |
| J15 & J16  | <i>M. javanica</i>  | ۲           | پسته (کله قوچی)                     | رفسنجان (انار، بهآباد)           |
| J17- J26   | <i>M. javanica</i>  | ۱۰          | پسته (احمد آقایی، کله قوچی، بادامی) | رفسنجان (نوق، اسماعیل آباد)      |
| J27- J32   | <i>M. javanica</i>  | ۶           | پسته (فندقی)                        | رفسنجان (خنامان، قنات علی آباد)  |
| J33- J36   | <i>M. javanica</i>  | ۴           | پسته (فندقی)                        | رفسنجان (خنامان، چاه گز)         |
| J37- J39   | <i>M. javanica</i>  | ۳           | پسته (فندقی)                        | رفسنجان (کیوترخان، آزادی)        |
| J40        | <i>M. javanica</i>  | ۱           | پسته (فندقی)                        | رفسنجان (کیوترخان، طالق آباد)    |
| J41 & J42  | <i>M. javanica</i>  | ۲           | پسته (فندقی)                        | رفسنجان (کیوترخان، صبوری)        |
| J43- J45   | <i>M. javanica</i>  | ۳           | پسته (کله قوچی، فندقی)              | رفسنجان (ده شیخ)                 |
| J46 & J47  | <i>M. javanica</i>  | ۲           | پسته (کله قوچی)                     | رفسنجان (همت آباد، حجت آباد)     |
| J48- J50   | <i>M. javanica</i>  | ۳           | پسته (کله قوچی، اکبری)              | رفسنجان (همت آباد، رضائیه)       |
| J51 & J52  | <i>M. javanica</i>  | ۲           | پسته (فندقی)                        | رفسنجان (مرکز تحقیقات پسته کشور) |
| J53- J55   | <i>M. javanica</i>  | ۳           | پسته (فندقی)                        | کرمان (باغین، قندآباد)           |
| J56- J60   | <i>M. javanica</i>  | ۵           | پسته (فندقی)                        | کرمان (زرنند، محمود زکایی)       |
| J61- J65   | <i>M. javanica</i>  | ۵           | پسته (فندقی)                        | کرمان (زرنند، تاج آباد)          |
| J66 & J67  | <i>M. javanica</i>  | ۲           | پسته (فندقی)                        | کرمان (زرنند، دریانی)            |
| J68        | <i>M. javanica</i>  | ۱           | پسته (فندقی)                        | کرمان (زرنند، فاز شیخها)         |
| J69 & J70  | <i>M. javanica</i>  | ۲           | پسته (کله قوچی، اکبری)              | کرمان (بردسیر، نصرآباد ۲)        |
| J71 & J72  | <i>M. javanica</i>  | ۲           | پسته (اکبری)                        | کرمان (بردسیر، روستای هجین)      |
| J73 & J74  | <i>M. javanica</i>  | ۲           | پسته (فندقی)                        | سیرجان (شهربابک، ۱۰۱)            |
| J75- J77   | <i>M. javanica</i>  | ۳           | پسته (کله قوچی)                     | سیرجان (شهربابک، ۲۲ بهمن)        |
| J78- J82   | <i>M. javanica</i>  | ۵           | پسته (کله قوچی، اکبری، فندقی)       | سیرجان (دوچاهی)                  |
| J83- J85   | <i>M. javanica</i>  | ۳           | گوجه فرنگی                          | رفسنجان (داوران)                 |
| J88- J86   | <i>M. javanica</i>  | ۳           | بادمجان                             | رفسنجان (داوران)                 |
| J89- J91   | <i>M. javanica</i>  | ۳           | خیار                                | رفسنجان (داوران)                 |
| IN1-IN4    | <i>M. incognita</i> | ۴           | پسته (فندقی، کله قوچی، بادامی)      | رفسنجان                          |
| IN5        | <i>M. incognita</i> | ۱           | پسته (فندقی)                        | سیرجان (دوچاهی)                  |
| AR1-AR4    | <i>M. arenaria</i>  | ۴           | پسته (فندقی، کله قوچی، بادامی)      | رفسنجان                          |

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 ۲۴-۴۸ 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 اندازه‌گیری 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 ۳۰-۵۰ 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 به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شد. لوله‌های حاوی نماتود در نیتروژن مایع قرار گرفت سپس نمونه به هاون کوچک منتقل و کاملاً در حضور نیتروژن مایع ساییده شد. ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۱۰۰mM Tris-HCl pH۸، ۱/۴M NaCl، ۱mM EDTA، ۲۰mM CTAB، ۳٪ β-mercaptoethanol) اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۵°C و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰°C نگه‌داری شدند. در مرحله بعد در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند و فاز رویی به لوله جدید منتقل گردید. سپس هم حجم آن، مخلوط کلروفرم-ایزوامیل الکل (۲۴:۱) اضافه و پس از یک تکان شدید و مخلوط شدن کامل به مدت 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 به مدت ده دقیقه در ۲۰°C قرار گرفت و پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور

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 اسپکتروفتومتری استفاده گردید. در این تحقیق دو جفت آغازگر اختصاصی *Mjavf* / *Mjavr* (۲۳) و *OPAFjav* / *OPARjav* (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. به دلیل 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 به عنوان 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،  $Taq\ DNA\ Polymerase$  ۱/۵ Unit/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،

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

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

موج دار، ممتد یا شکسته، انتهای دم غالباً مشخص و خطوط سطوح جانبی بدن به طور مشخص شبکه کوتیکولی انتهای بدن را به دو قسمت پشتی و شکمی تقسیم می کنند و فازمیدها به صورت 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 به صورت 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، گره های استایلت گرد و جانبی و قسمت مخروطی کمی بلندتر از قسمت استوانه ای، دم مخروطی شکل و انتهای آن به طور ظریفی گرد شده با طول ۴۶ تا ۵۷ میکرومتر و هیالین به طول ۱۱ تا ۱۶ میکرومتر می باشد (جدول ۳).

در این تحقیق به منظور 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 روش ها، از آنجایی که عواملی مانند زمان، هزینه و خلوص DNA در تمامی روش های مورد استفاده یکسان بود، روش سیلوا و همکاران جهت استحصال DNA از نظر کمیت، مناسب تشخیص داده شد و DNA کلیه جمعیت های مورد مطالعه به این روش استخراج گردید. مقدار DNA استخراج شده از ۳۰  $\mu$ l 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 به دست آمده از لارو سن دوم و تخم نسبت به

$Taq$  DNA Polymerase ۱/۵ Unit/ $\mu$ l و ۲ میکرولیتر DNA الگو (۲۵ ng/ $\mu$ l) با برنامه حرارتی شامل یک مرحله دو دقیقه ای در  $94^{\circ}\text{C}$  و سپس ۳۵ چرخه  $94^{\circ}\text{C}$  برای ۳۰ ثانیه،  $58^{\circ}\text{C}$  برای ۳۰ ثانیه و  $72^{\circ}\text{C}$  برای یک دقیقه و در پایان یک مرحله گسترش نهایی در  $72^{\circ}\text{C}$  برای پنج دقیقه انجام گرفت. برای جلوگیری از تبخیر مواد یک قطره روغن معدنی سترون (Mineral Oil) به هر لوله اضافه شد و سپس لوله ها در دستگاه ترموسایکلر (Genius FGEN 05 TD) قرار گرفتند. پس از اتمام واکنش ۵۰  $\mu$ l PCR از محصول PCR با دو میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و در چاهک های ژل آگارز ۱/۲٪ در بافر TBE (Tris Borate EDTA) بارگیری شد و نشانگر  $\lambda$  (Roche MIII) (*HindIII-EcoRI*) نیز در اولین چاهک ژل به طور جداگانه برای تخمین اندازه قطعات تولیدی استفاده گردید

## نتایج و بحث

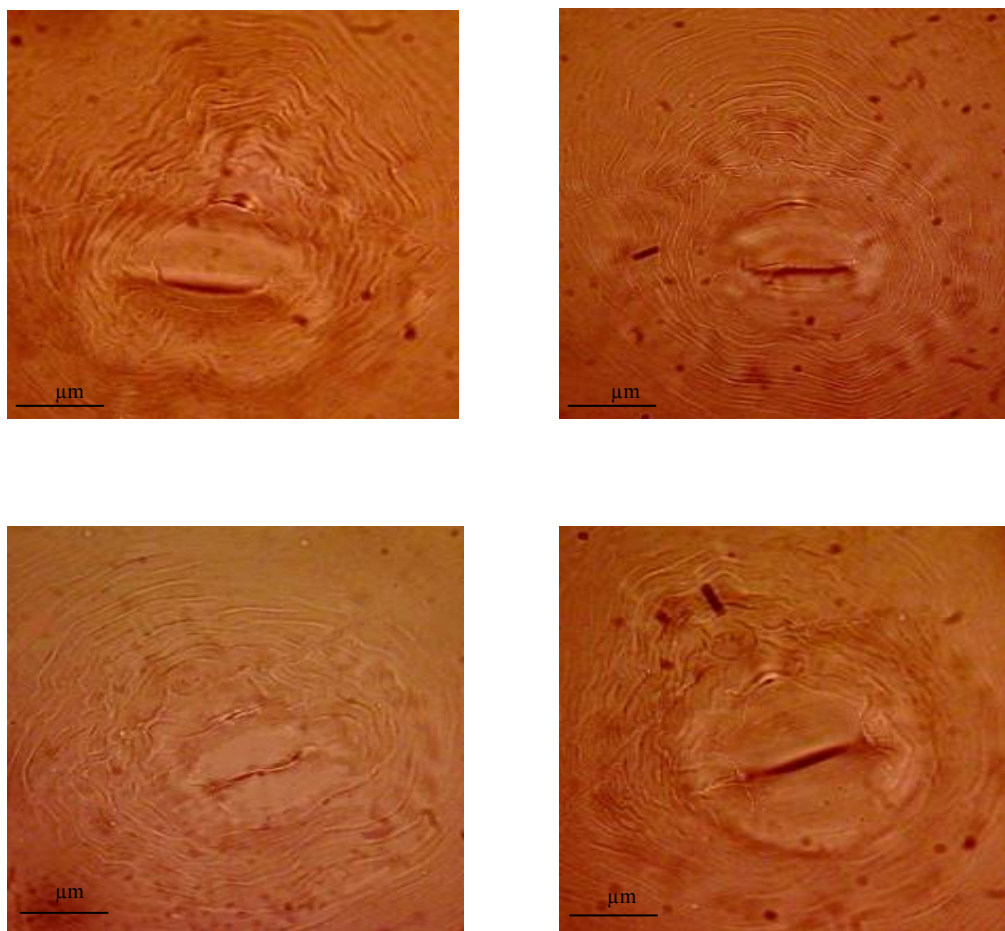
گونه *M. javanica* با استفاده از خصوصیات ریخت شناسی و ریخت سنجی ماده های بالغ و لارو سن دوم بر اساس منابع موجود شناسایی شد (۴، ۵، ۶، ۱۲ و ۱۶). بدن ماده ها نسبتاً گرد، گردن مشخص، شیری رنگ، انتهای بدن همسطح با بقیه بدن و یا کمی برجسته، سر همطراز با بدن با کلاهک مشخص، سر دارای یک شیار عرضی پس از کلاهک سر، شبکه کوتیکولی با رشد متوسط، استایلت باریک و قسمت مخروطی ۵۰/۶٪ طول کل آن و به طرف پشتی خمیده می باشد (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

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

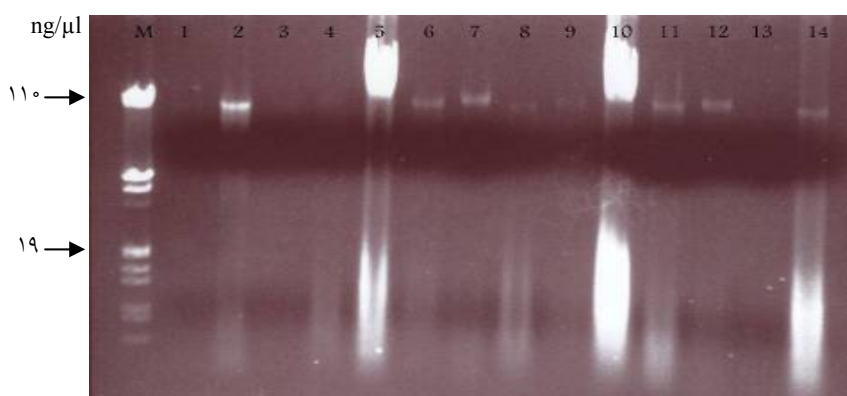
| مشخصات                                    | ماده‌ها<br>(به میکرومتر) | لارهای سن دوم<br>(به میکرومتر) |
|-------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| طول بدن                                   | ۶۹۰-۹۶۴ (۸۲۸/۳)          | ۳۹۵-۴۲۰ (۴۱۰/۸)                |
| عرض بدن                                   | ۳۵۰-۵۳۰ (۴۶۳)            | ۹-۱۱ (۱۰/۸)                    |
| طول استایل                                | ۱۵/۵-۱۸ (۱۶)             | ۱۰/۵-۱۳ (۱۱/۴)                 |
| ارتفاع گره استایل                         | ۲-۳ (۲/۶)                | ۱-۱/۶ (۱/۴)                    |
| عرض گره استایل                            | ۲-۵ (۴)                  | ۲-۲/۴ (۲/۲)                    |
| محل ریزش محتوای غده پستی                  | ۳-۶ (۴/۶)                | ۲/۵-۴ (۳/۲)                    |
| حد فاصل انتهایی بالایی تا روزنه ترشچی     | ۴۲-۴۷ (۴۵)               | -                              |
| حد فاصل انتهایی 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 انتهایی دم                   | -                        | ۱۱-۱۶ (۱۳)                     |
| طول بدن/ طول دم                           | -                        | ۷-۹ (۸/۳)                      |

این که 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°C استفاده گردید و بدین ترتیب مناسب‌ترین دمای اتصال برای جفت آغازگر OPARjav/OPAFjav، ۶۴°C و برای جفت آغازگر Mjavf / Mjavr، ۵۸°C در نظر گرفته شد. هم‌چنین از عامل تغییر میزان  $MgCl_2$  نیز برای بهینه‌سازی واکنش PCR

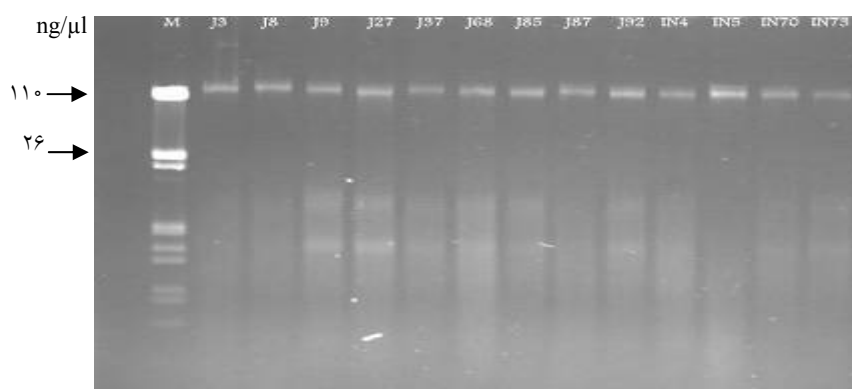
نماتودهای ماده بالغ مطلوب‌تر ارزیابی شد. از آنجایی که دستیابی به لارو سن دوم نیاز به وقت بیشتری داشت، در کلیه نمونه‌ها از تخم نماتود جهت استخراج DNA استفاده گردید (شکل ۲). جهت انجام واکنش PCR، غلظت DNA در تمام نمونه‌ها ۲۵ng/μl تنظیم گردید (شکل ۳). در آزمایش‌های انجام شده اولیه هر دو جفت آغازگر، باندهای غیر اختصاصی در بالای باند اصلی تولید کردند اما این باند اضافه در گونه *M. arenaria*، *M. incognita* و آب مقطر که به‌عنوان کنترل منفی در آزمایش گنجانده شده بودند تکثیر نشد. با توجه به



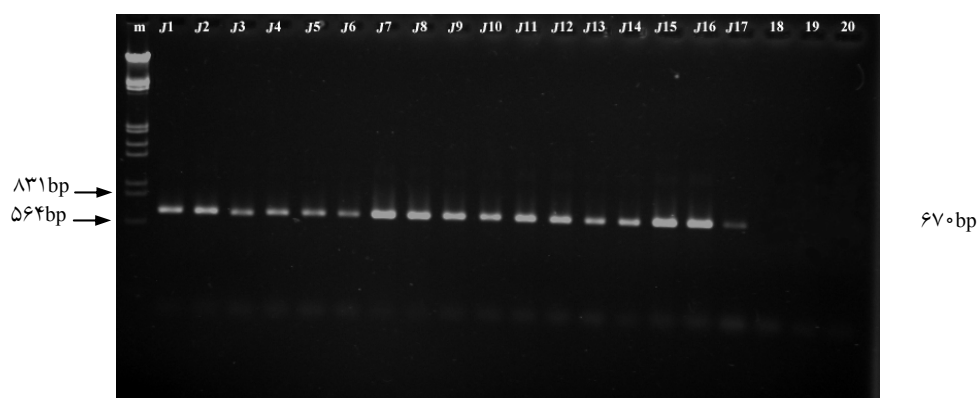
شکل ۱. شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده بالغ گونه *M. javanica*



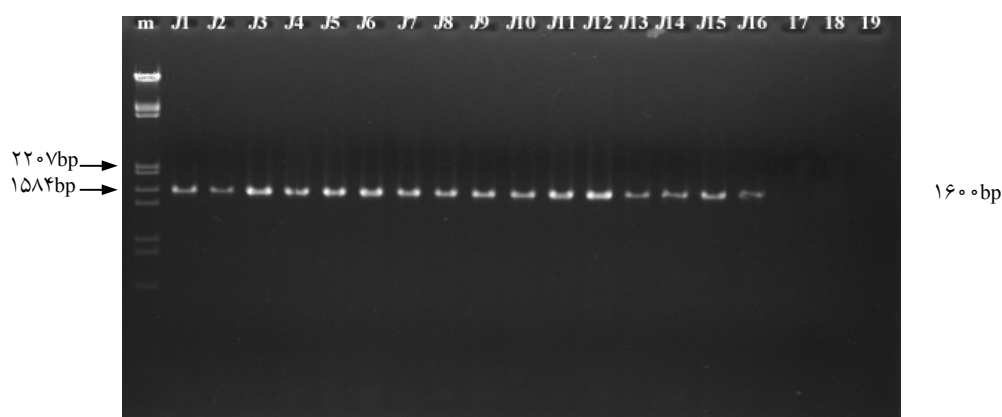
شکل ۲. الکتروفورز DNA استخراج شده با روش‌های: سیلوا و همکاران (۱، ۲، ۳ و ۴ استخراج از ماده بالغ، ۵ استخراج از تخم نماتود، ۱۰ استخراج از لارو سن دوم)، فارگت و همکاران (۶ استخراج از تخم نماتود، ۷ استخراج از لارو سن دوم)، دانگ و همکاران (۸ استخراج از تخم نماتود، ۹ استخراج از لارو سن دوم)، سوین و همکاران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



شکل ۳. تعیین غلظت DNA استخراج شده با روش سیلوا و همکاران با استفاده از مقدار DNA باندهای نشانگر DNA III (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) نشانگر III DNA (m) گونه *M. incognita* (17) گونه *M. arenaria* (18) آب مقطر (19)

استفاده شد. غلظت‌های مختلف  $MgCl_2$  مورد آزمایش قرار گرفت و مناسب‌ترین غلظت برای جفت آغازگر OPAFjav / OPARjav 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 OPAFjav / OPARjav، 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 به دست 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 آغازگر OPAFjav / OPARjav 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 (شکل ۵). نتایج حاصل با نتایج به دست آمده توسط دانگ و همکاران (۳) 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 استخراج DNA با انجام واکنش PCR با آغازگر اختصاصی Mjavf / Mjavr، قطعه ۱۶۰۰ جفت‌بازی در جمعیت‌های مختلف *M. javanica* به دست 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 l'étude 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.

- 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.