پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۱۱ (۴): ۷۲-۶۳ (۱۴۰۱)- مقاله پژوهشی
Journal of Applied Research in Plant Protection 11(4): 63-72 (2023)-Research Article
DOI: https://dx.doi.org/ 10.22034/ARPP.2022.15747

شناسایی اختصاصی نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne incognita* رایج در باغات کیوی‌فروت استان‌های گیلان و مازندران با استفاده از توالی ژن *sec-1*

سیده نجمه بنی‌هاشمیان[۱]، سالار جمالی[۱]✉، مرتضی گل‌محمدی[۲]، محمود قاسم نژاد[۳]

[۱]گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. [۲]موسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران. [۳]گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
✉jamali_s2002@yahoo.com

دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۵ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۱۶ پذیرش: ۱۴۰۱/۱/۱۳

چکیده

در سال‌های اخیر، شیوع بیش از پیش نماتدهای ریشه‌گرهی باعث ایجاد خسارت جدی در مناطق کشت کیوی‌فروت در شمال ایران شده است. با توجه به رواج چند گونه از این جنس در کشور، شناسایی دقیق گونه‌های این نماتد در صنعت تولید محصول حائز اهمیت است. در این تحقیق، تلاش شد شناسایی مولکولی نماتد ریشه‌گرهی به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن کدکننده یکی از پروتئین‌های غدد مری (pharyngeal gland secretory protein, sec-1) در جهت تایید شناسایی‌های مبتنی بر ویژگی‌های ریخت‌شناختی صورت گیرد. بدین منظور، پس از انجام نمونه‌برداری و جداسازی نماتدها از باغ‌های کیوی‌فروت آلوده در استان‌های گیلان و مازندران، اقدام به شناسایی اولیه با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناختی گردید. جفت آغازگرهای Inc-K14 برای تکثیر ناحیه SCAR و جفت آغازگرهای SEC-1 برای تکثیر ژن *sec*-1 به منظور تشخیص اختصاصی گونه *Meloidogyne incognita* از سایر گونه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. در همه نمونه‌های مورد بررسی، قطعه‌ای ۳۹۹ جفت بازی توسط جفت آغازگرهای Inc-K14 و قطعه‌ای ۵۰۲ جفت بازی توسط جفت آغازگرهای SEC-1 تکثیر گردید که قطعات مورد انتظار برای شناسایی گونه *M. incognita* می‌باشند. انجام آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای Rjav/Fjav، Rar/Far و Rh/Fh که به ترتیب آغازگرهای اختصاصی گونه‌های *M. javanica*، *M. arenaria* و *M. hapla* هستند، در این مطالعه منجر به تکثیر باند نشد. با توجه به نتایج به دست آمده، آغازگر SEC-1 جهت شناسایی سریع و دقیق *M. incognita* در باغ‌های آلوده کیوی‌فروت (در این مطالعه) مناسب بوده و مشکلات تکثیر غیراختصاصی با آغازگرهای Inc-K14 که ناحیه SCAR را تکثیر می‌کنند، نخواهد داشت.

کلمات کلیدی: آغازگر SEC-1، شناسایی مولکولی، ناحیه SCAR

Specific identification of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* common in kiwifruit orchards of Guilan and Mazandaran provinces using *sec*-1 gene sequence

Seyedeh Najmeh Banihashemian[1], Salar Jamali[1]✉, Morteza Golmohammadi[2], Mahmood Ghasemnejad[3]

[1]Plant Protection Department, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. [2]Horticultural Science Research Institute, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran, [3]Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. ✉jamali_s2002@yahoo.com

Received: 15 Jan 2022 Revised: 26 Jan 2022 Accepted: 2 Apr 2022

Abstract

In recent years, the increasing prevalence of root knot nematodes has caused serious damage to kiwifruit cultivation in northern Iran. Due to the prevalence of several species of this genus in the country, accurate identification of species of this nematode in the kiwifruit industry is important. In this study, we attempted to identify the root knot nematode species by polymerase chain reaction, using specific primers of the gene encoding one of the pharyngeal glands secretory proteins (*sec-1*) to confirm the morphological identifications. After sampling and isolation of the nematodes from kiwifruit orchards in Guilan and Mazandaran provinces, initial identification was performed using morphological characteristics. The Inc-k14 primer pair was used to amplify the SCAR region and the SEC-1 primer pair was used to amplify the *sec-1* gene for specific identification of *Meloidogyne incognita* from the other species. In all samples, a 399 bp was amplified by Inc-K14 primers and a 502 bp fragment was amplified by SEC-1 primers, which are expected as specific bands for *M. incognita*. The PCR test using Rjav/Fjav, Rar/Far, and Rh/Fh primers, which are specific primers of *M. javanica*, *M. arenaria* and *M. hapla*, respectively, did not lead to band amplification in this study. According to the results, SEC-1 primer is suitable for rapid and accurate identification of *M. incognita* in infested kiwifruit orchards (in present study) and will not have non-specific band amplification problems using Inc-K14 primers that amplify the SCAR region.

Keywords: Molecular identification, SEC-1 primer, SCAR region

How to cite:
Banihashemian SN, Jamali S, Golmohammadi M, Ghasemnejad M, 2023. Specific identification of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* common in kiwifruit orchards of Guilan and Mazandaran provinces using *sec*-1 gene sequence. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 11 (4): 63–72.

مقدمه

نماتدهای انگل گیاهی تهدید مهمی برای صنعت کشاورزی جهان به شمار می‌روند (Thoden *et al*. 2011). این عوامل تولیدات گیاهی را به لحاظ کمی و کیفی تحت تأثیر قرار می‌دهند (Sikora *et al*. 2018). نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) باعث ایجاد گال در ریشه، کاهش سیستم ریشه‌ای و مستعد نمودن گیاهان در برابر بیماری‌های قارچی و باکتریایی و در نتیجه کاهش عملکرد محصول می‌شوند (Karssen 2002; Sikora *et al*. 2018). این نماتدها، انگل داخلی بوده و می‌توانند ریشه‌های بیشتر از ۳۰۰۰ گونه گیاهی را مورد حمله قرار دهند (Abad *et al*. 2003). همچنین با تنوعی از گونه‌های مختلف، در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان پراکنده‌اند (Jones *et al*. 2013) و در صورت وجود شرایط مساعد، قادرند جمعیت خود را به آسانی در خاک افزایش دهند (Calderon-Urrea *et al*. 2016; Hajihassani *et al*. 2018). اتخاذ روش‌های مدیریتی مناسب جهت کنترل، مستلزم شناسایی صحیح گونه مورد نظر می‌باشد. بنابراین، شناسایی سریع و دقیق نماتدهای ریشه‌گرهی برای جلوگیری از گسترش و انتخاب اقدامات کنترلی مؤثر علیه آنها مهم است (Subbotin *et al*. 2021).

بر اساس آخرین آمار فائو در سال ۲۰۱۹، میزان تولید و سطح زیر کشت کیوی‌فروت در جهان به ترتیب ۴۳۴۸۰۱۱ تن و ۲۶۸۷۸۸ هکتار می‌باشد (FAO 2020). ایران در بین تولید کنندگان محصول کیوی‌فروت، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است (Golmohammadi *et al*. 2019) و از نظر تولید، با ۳۴۴ هزار تن و از لحاظ سطح زیر کشت با ۱۲۷۷۳ هکتار، رتبه چهارم را در جهان دارا می‌باشد (FAO 2020). با این حال، بیماری‌های مختلفی، تولید این محصول را تهدید می‌کند که نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne* spp. یکی از مخرب‌ترین آن‌هاست. در نتیجه شناسایی عوامل خسارت‌زای کیوی‌فروت از جمله نماتد ریشه‌گرهی، می‌تواند در مدیریت تولید آن تأثیرگذار باشد (Tao *et al*. 2017). خصوصیات ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی مانند شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده، اندازه کلی بدن لاروها، نرها و ماده‌ها (Eisenback & Triantaphyllou 1991) از روش‌های مرسوم در شناسایی گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی می‌باشند. از گونه‌های رایج این جنس، *M. incognita* (Kofoid & White 1919) Chitwood 1949، *M. javanica* (Treub 1885) Chitwood 1949، *M. arenaria* (Neal 1889) Chitwood 1949 و *M. hapla* Chitwood 1949 هستند که به طور وسیع در سطح جهانی پراکنده‌اند.

علاوه بر این چهار گونه، ۴۹ گونه از گونه‌های *Meloidogyne* از نظر جغرافیایی محدود به برخی کشورها می‌باشند که در این میان، بیش از ۲۵ گونه از آسیا گزارش شده است (Subbotin *et al*. 2021). در بیشتر مناطق ایران، چهار گونه رایج برشمرده، به تعداد زیادی از گیاهان باغی و زراعی خسارت وارد می‌کنند (Eskandarzadeh 2020). استفاده از خصوصیات شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده (perineal pattern)، رایج‌ترین صفت تشخیصی ریخت‌شناختی گونه‌های *Meloidogyne* می‌باشد (Hasan *et al*. 2020) اما با توجه به تعداد زیاد گونه‌های *Meloidogyne* و تنوع بالای آن‌ها در ویژگی‌های ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی، شناسایی دقیق آنها با این روش، اغلب فرآیندی دشوار است. امروزه روش‌های مولکولی ابزارهای سریع‌تر و مطمئن‌تری را برای شناسایی گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی نسبت به روش‌های ریخت‌شناختی فراهم می‌کنند (Subbotin *et al*. 2021). البته این قاعده در مورد سایر عوامل بیماری‌زا نیز مصداق داشته و روش‌های تشخیص مولکولی، مکمل مطالعات ریخت‌شناختی و یاری‌کننده شناسایی دقیق، به هنگام و در نهایت، اتخاذ راهکارهای صحیح کنترل آنها خواهد بود (Arzanlou *et al*. 2016; Ghasemi Esfahlan *et al*. 2019).

روش‌های مولکولی مبتنی بر DNA مانند چندشکلی در طول قطعات هضم شده (RFLP: Restriction fragment length polymorphisms)، چند شکلی قطعات DNA حاصل از تکثیر تصادفی (RAPD: Random amplified polymorphic DNA)، نواحی تکثیر یافته با توالی شناخته شده (SCAR: Sequence characterized amplified regions)، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی (Real-time PCR) و توالی‌یابی (Sequencing) ابزارهای مناسبی برای ردیابی و شناسایی نماتدهای ریشه‌گرهی می‌باشند (Subbotin *et al*. 2021). در واکنش RAPD-PCR، باندهای اختصاصی از یک گونه را توالی‌یابی نموده و از روی توالی‌های به‌دست آمده، آغازگرهایی را طراحی می‌کنند که طول بیشتری نسبت به آغازگرهای RAPD دارند. به این توالی‌های اختصاصی که از روی آن‌ها طراحی صورت می‌گیرد، آغازگرهای نواحی تکثیر یافته با توالی شناخته شده (SCARs: Sequence-characterized amplified regions) می‌گویند. این آغازگرها نسبت به تغییر شرایط واکنش، حساسیت کمتری از آغازگرهای RAPD داشته و اختصاصی‌تر عمل می‌کنند. همچنین این روش، به سن و مرحله رشدی نماتد بستگی نداشته و از توانایی تکثیر DNA استخراج شده از ماده‌های بالغ، لارو و توده تخم نماتد برخوردار است (Fourie *et al*. 2001; Salgado *et al*. 2015). با

عنایت به اینکه اکثر آغازگرها با طیف وسیعی از نمونه‌ها مورد آزمایش قرار نگرفته‌اند، ممکن است آغازگرهای اختصاصی، نتایج مثبت و منفی کاذب نشان دهند (Subbotin *et al*. 2021).

در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای درک سازوکار بیماری‌زایی نماتدهای ریشه‌گرهی انجام شده است و اعتقاد بر این است که پروتئین‌های سنتز شده در غدد مری و تزریق شده از طریق استایلت به بافت گیاه، نقش کلیدی در ایجاد رابطه انگلی نماتدها دارند (Hewezi & Baum 2013). این پروتئین‌های ترشحی بخشی از افکتورهای نماتدها بوده و به عنوان عوامل موثر در تشکیل و نگهداری سلول‌های غول آسا (Giant cell) برای حمایت از رابطه انگلی نماتد و میزبان عمل می‌کنند (Ray *et al*. 1994; Quentin *et al*. 2013). برخی از آنها آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی (مانند بتا ۱ و ۴- اندوگلوکاناز) هستند و همچنان انواع متعددی از این پروتئین‌ها شناخته شده است. یکی از این پروتئین‌های ترشحی غدد مری به نام SEC-1 در جایگاه MIU09180، از ژنوم *M. incognita* شناسایی شده و توالی آن در تشخیص اختصاصی این گونه مورد استفاده قرار گرفته است (Ray *et al*. 1994; Akyazi & Felek 2013).

تشخیص گونه‌های جنس *Meloidogyne* دشوار بوده و اکثر تحقیقات صورت گرفته در این خصوص، بر اساس ژن‌های میتوکندریایی، ناحیه سیتوکروم اکسیداز (COXs)، ایزوآنزیم‌ها و ژن‌های کدکننده RNA ریبوزومی (rDNA) استوار است (Alvarez-Ortega *et al*. 2019). نشانگرهای رایج ریبوزومی نمی‌توانند به طور دقیق باعث تمایز گونه‌های رایج این جنس شامل: گونه‌های *M. incognita*، *M. arenaria*، *M. javanica* و *M. floridensis* Chen & Zheng 1990 که گروه گونه‌های *M. incognita* (*M. incognita* group) را تشکیل می‌دهند، شوند (Subbotin *et al*. 2021). یکسانی بالا در توالی‌های نواحی SCAR در گونه‌های *M. incognita*، *M. arenaria* و *M. javanica* (به طور مثال، قطعه‌ای به طول ۴۳۶ جفت‌باز برای سه گونه نام برده، یکسانی توالی بالایی دارند) نیز مانع تفکیک دقیق گونه‌های نام برده می‌شود (Tesarova *et al*. 2003). برای رفع این محدودیت‌ها، تلاش شده است از نشانگرهای ژنتیکی دیگری مانند ژن کد کننده پروتئینی به نام SEC-1 که یکی از پروتئین‌های غدد مری است، برای تشخیص دقیق *M. incognita* استفاده شود. آغازگرهای SEC به ابتدا و انتهای ژن مربوطه (شکل ۳) متصل می‌شوند و از آنجا که اگزون و اینترون‌ها را در بر می‌گیرند، چنانچه توالی‌های ناحیه کدشونده بین گونه‌ها یکسانی توالی بالایی داشته باشند، تفاوت در توالی‌های مناطق غیر کدشونده، تفاوت بین گونه‌ای را آشکار خواهد نمود (Tesarova *et al*. 2003). بنابراین، ردیابی مولکولی این نماتدها با استفاده از جفت آغازگرهای نام برده شده، روشی مفید برای شناسایی دقیق گونه *M. incognita* تلقی می‌شود.

مطالعات میدانی و نمونه‌برداری‌های انجام شده در سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۸، بیانگر وقوع آلودگی‌های بالای درختان کیوی‌فروت در باغات نسبت به نماتد ریشه‌گرهی در دو استان مازندران و گیلان بود. بنابراین هدف از انجام مطالعه حاضر، پایش آلودگی منطقه و ارزیابی روشی سریع و قابل اطمینان جهت شناسایی دقیق گونه نماتد ریشه‌گرهی بروز یافته در باغ‌های آلوده کیوی‌فروت بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در طی ماه‌های اردیبهشت تا مرداد سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ از باغ‌های کیوی‌فروت آلوده به نماتد ریشه‌گرهی استان‌های گیلان و مازندران نمونه‌برداری انجام شد. ابتدا ده باغ و از هر باغ پنج تا ده درخت انتخاب شد. ریشه‌های آلوده مشکوک به نماتد ریشه‌گرهی (چهار نقطه از اطراف درخت) نمونه‌برداری، شماره گذاری (جدول ۱) و به آزمایشگاه پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری انتقال داده شدند.

شناسایی ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی

شناسایی اولیه در مورد نمونه‌های جمع‌آوری شده بر اساس ویژگی‌های نقوش اثر انگشتی شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌ها صورت گرفت (Hartman & Sasser 1985). به این منظور، ابتدا تک توده تخم (single egg mass) در سوراخ‌هایی به عمق سه تا پنج سانتی‌متر مجاور ریشه‌های نشاء گوجه‌فرنگی (رقم ارلی اوربانا) در مرحله دو تا چهار برگی اضافه و در شرایط مناسب گلخانه به مدت ۴۵ تا ۶۰ روز نگه‌داری شدند. پس از بررسی ریشه‌ها و مشاهده گال زیر استریومیکروسکوپ، طبق روش Taylor & Netscher (۱۹۷۴) با برش کوتاهی روی گال و خارج شدن نماتد ماده از بافت ریشه، از شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌ها برشی تهیه و با بررسی آن‌ها، شناسایی اولیه انجام شد. از نمونه‌های مورد مطالعه، برای استخراج DNA استفاده شد.

جدول ۱. مشخصات منطقه و کد جمعیت‌های مورد مطالعه نماتد ریشه‌گرهی از باغ‌های کیوی‌فروت دو استان مازندران و گیلان.

Table 1. Characteristics of the studied populations of root-knot nematode from kiwifruit orchards in Mazandaran and Guilan provinces.

No.	Code	Site
1	*Ra-P1*	Mazandaran, Ramsar
2	*Ra-P2*	Mazandaran, Ramsar
3	*Ra-P3*	Mazandaran, Ramsar
4	*Ra-P4*	Mazandaran, Ramsar
5	*To- D1*	Mazandaran, Tonekabon, Dohezar
6	*To- D2*	Mazandaran, Tonekabon, Dohezar
7	*La-S1*	Guilan, Lahijan
8	*La-S2*	Guilan- Lahijan
9	*R-U1*	Guilan- Rasht
10	*R-U2*	Guilan- Rasht

استخراج DNA نماتد با روش (Da Silva *et al*. 2000) با اندکی تغییرات انجام شد. بدین صورت‌که ۳۰ میکرولیتر مخلوط تخم، لارو سن دوم و نماتد ماده بالغ به مدت نیم ساعت در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از افزودن بافر استخراج (100mM Tris-Hcl pH 8; 1/4M NaCl; 20mM EDTA; 3%CTAB; 1%mercaptoethanol) در ۱۰۰۰۰ دور به مدت پنج دقیقه رسوب‌دهی شدند. سپس نمونه‌ها ۳۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. عصاره حاصله پس از رسوب‌دهی، با مخلوط کلروفرم ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) تیمار شد. بخش قابل حل به‌وسیله رسوب ایزوپروپانول سرد تغلیظ شده و شستشو با اتانول ۷۰ درصد انجام گردید. رسوب حاصله در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل و کمیت و کیفیت نمونه‌ها با دستگاه نانودراپ (BMG LABTECH, Germany) در طول موج ۲۶۰ نانومتر بررسی شد.

به منظور تأیید شناسایی اولیه، شناسایی گونه نمونه‌های خالص شده (۱۰ نمونه)، با آغازگرهای اختصاصی نماتد ریشه‌گرهی انجام شد. از جفت آغازگرهای اختصاصی Inc-K14 (برای تکثیر ناحیه SCAR) و جفت آغازگرهای اختصاصی SEC-1 (برای تکثیر ژن *sec-1*)، برای شناسایی اختصاصی *M. incognita* استفاده شد (جدول ۲). آغازگرهای اختصاصی Rjav/Fjavبرای شناسایی اختصاصی *M. javanica*، Far/Rar برای شناسایی اختصاصی *M. arenaria* و Fh/Rh برای شناسایی اختصاصی *M. hapla* به عنوان کنترل منفی استفاده شدند.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط واکنش Master mix (Fermentas, USA)، ۸/۵ میکرولیتر آب استریل، یک میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ Pmol/µl) و دو میکرولیتر DNA نماتد (غلظت ۵۰ نانوگرم) در دستگاه ترموسایکلر مدل MJ RESEARCH PTC-200 انجام شد. همچنین، از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برنامه دمایی هر کدام از آغازگرها در جدول ۳ آمده است.

پس از انجام PCR، محصول در ژل آگارز یک درصد در بافر TBE 1X الکتروفورز، ران شده و باندهای تکثیر شده با دستگاه UV ترانسلومیناتور مدل UVP، مشاهده شد. محصول PCR های حاصله توالی‌یابی شد و نتیجه به دست آمده با توالی‌های موجود در پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (www.ncbi.nlm.nih.gov) مقایسه و زیر هم چینی با توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک ژن توسط نرم‌افزار MEGA X انجام شد (شکل ۳). جفت آغازگرهای SEC-1 مربوط به دو ناحیه کدشونده و غیر کدشونده هستند. شکل ۳ نشان دهنده زیر هم چینی توالی نوکلئوتیدی، پروتئینی و موقعیت آغازگرها، در نواحی کدشونده و غیر کدشونده براساس بررسی (Tesarova *et al*. 2003) می‌باشد.

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای استفاده شده در شناسایی گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی.

Table 2. Primers used for identification of root-knot nematode species.

Primer	Species	Type primer or Gene fragment	Fragment (bp)	Sequence (5´-3´)	TM (°C)	Reference
Inc-K14-F	*M. incognita*	SCAR	399	GGGATGTGTAAATGCTCCTG	60	Randig *et al*, 2002
Inc-K14-R	*M. incognita*	SCAR	399	CCCGCTACACCCTCAACTTC	60	Randig *et al*, 2002
SEC-1-F	*M. incognita*	pharyngeal gland protein gene	502	GGGCAAGTAAGGATGCTCTG	60	Tesarova *et al*, 2003
SEC-1-R	*M. incognita*	pharyngeal gland protein gene	502	CGTGGCTATGAAAGAGGTGC	60	Tesarova *et al*, 2003
Fjav	*M. javanica*	SCAR	670	GGTGCGCGATTGAACTGAGC	64	Zijlstra *et al*, 2000
Rjav	*M. javanica*	SCAR	670	CAGGCCCTTCAGTGGAACTA	64	Zijlstra *et al*, 2000
Far-F	*M. arenaria*	SCAR	420	TCCGCGATAGAGGTAAATGA	55	Zijlstra *et al*, 2000
Rar-R	*M. arenaria*	SCAR	420	TCGGCGATAGACACTACAAC	55	Zijlstra *et al*, 2000
Fh	*M. hapla*	SCAR	610	TGACGGCGGTGAGTGCGA	57	Zijlstra *et al*, 2000
Rh	*M. hapla*	SCAR	610	TGACGGCGGTACCTCATAG	57	Zijlstra *et al*, 2000

جدول ۳. برنامه حرارتی واکنش PCR برای آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه.

Table 3. Thermal program of PCR reaction for the used primers in this study.

Name of primer	Amplification condition
Inc-K14	94ºC 3 min 94ºC 30 s 60ºC 30 s 72ºC 7 min 35 cycles 94ºC 4 min
SEC-1	94ºC 60 s 60ºC 1 min 72ºC 5 min 35 cycles 94ºC 3 min
Fjav/Rjav	94ºC 30 s 64ºC 30 s 72ºC 7 min 35 cycles 94ºC 4 min
Far/Rar	94ºC 30 s 55ºC 30 s 72ºC 10 min 35 cycles 94ºC 4 min
Fh/Rh	94ºC 30 s 57ºC 30 s 72ºC 10 min 35 cycles

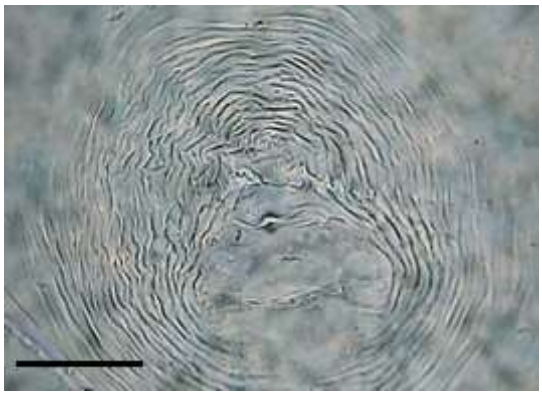
نتایج و بحث

شناسایی دقیق و سریع، یکی از ملزومات مدیریت تلفیقی نماتدهای بیمارگر گیاهی، در جهت تحقق کشاورزی پایدار محسوب می‌شود. خسارت‌های ایجاد شده توسط نماتدهای ریشه‌گرهی می‌تواند بسته به عواملی مانند آب و هوا، میزبان و گونه‌های خاص نماتد متفاوت باشد (Subbotin *et al*. 2021). به دلیل شباهت ریخت‌شناختی بالای بین گونه‌های *Meloidogyne*، تنوع درون گونه‌ای، شباهت بین گونه‌ای، زمان‌بر بودن، نیازمندی به مهارت و تجربه، تمایز دقیق گونه‌های این جنس دشوار است (Yang *et al*. 2021).

علاوه بر این، اکثر روش‌های تشخیصی با طیف وسیعی از نمونه‌ها آزمایش نشده و آزمایش‌های رایج برای درک جمعیت نماتد در خاک و تنوع گونه‌ها، چالش برانگیز می‌باشد. در نتیجه، روش‌های مبتنی بر PCR در تشخیص گونه‌های *Meloidogyne* اهمیت فزاینده‌ای یافته است. با این حال، ممکن است نتایج حاصله موارد مثبت و منفی کاذب را هم به همراه داشته باشند (Subbotin *et al*. 2021). با توجه به اینکه تنوع ژنتیکی قابل توجهی بین دسته‌های جنس *Meloidogyne* وجود دارد (Sellers *et al*. 2021)، شناسایی سریع و دقیق گونه‌ها برای مدیریت این بیمارگر و کاهش خسارت‌های وارده به گیاهان از جمله کیوی‌فروت، از اهمیت بالایی برخوردار است (Tao *et al*. 2017). توالی نوکلئوتیدی ناحیه rDNA نمی‌تواند به طور دقیق باعث تمایز گونه‌های رایج جنس *Meloidogyne* به خصوص چهار گونه نام برده در بالا شوند (Tesarova *et al*. 2003). به عنوان

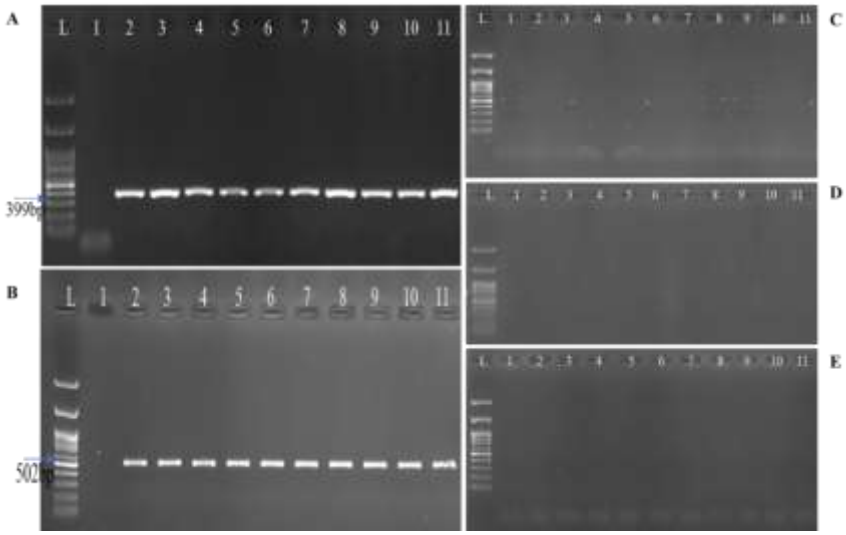
مثال، گزارشات مشابهی در زمینه عدم تفکیک دقیق سه گونه نماتد ریشه‌گرهی *M. incognita*، *M. javanica* و *M. arenaria* به علت وجود نواحی با حفاظت شدگی بالا در ژنوم، وجود دارند (Blok & Powers 2009; Janssen *et al*. 2016). نتایج اولیه به دست آمده در خصوص شناسایی ریخت‌شناختی برپایه الگوی انتهای بدن نماتد ماده در این مطالعه حاکی از این بود که گونه نماتد ریشه‌گرهی رایج در مناطق نمونه‌برداری شده، به گونه *M. incognita* تعلق دارد (شکل ۱).

از طرف دیگر، با توجه به اینکه روش‌های مولکولی شناسایی نماتدها از حساسیت زیادی برخوردار است، لذا این روش‌ها به عنوان مکمل روش‌های کلاسیک، امروزه برای شناسایی دقیق‌تر گونه‌های نماتدها به کار می‌روند (Gasser 2001; Hussey & Janssen 2002; Zeng *et al*. 2018). در این مطالعه، نمونه‌های DNA استخراج شده از نماتدهای ریشه‌گرهی به دست آمده از باغات کیوی‌فروت استان‌های مازندران و گیلان (جدول ۱) با تمامی آغازگرهای ذکر شده مورد تکثیر قرار گرفتند. نتایج آزمون‌های PCR انجام شده در شکل ۲ قابل ملاحظه است.



شکل ۱. نقوش کوتیکولی انتهای بدن نماتد ماده بالغ *M. incognita* جمع‌آوری شده از استان گیلان (اندازه = ۲۰میکرومتر).

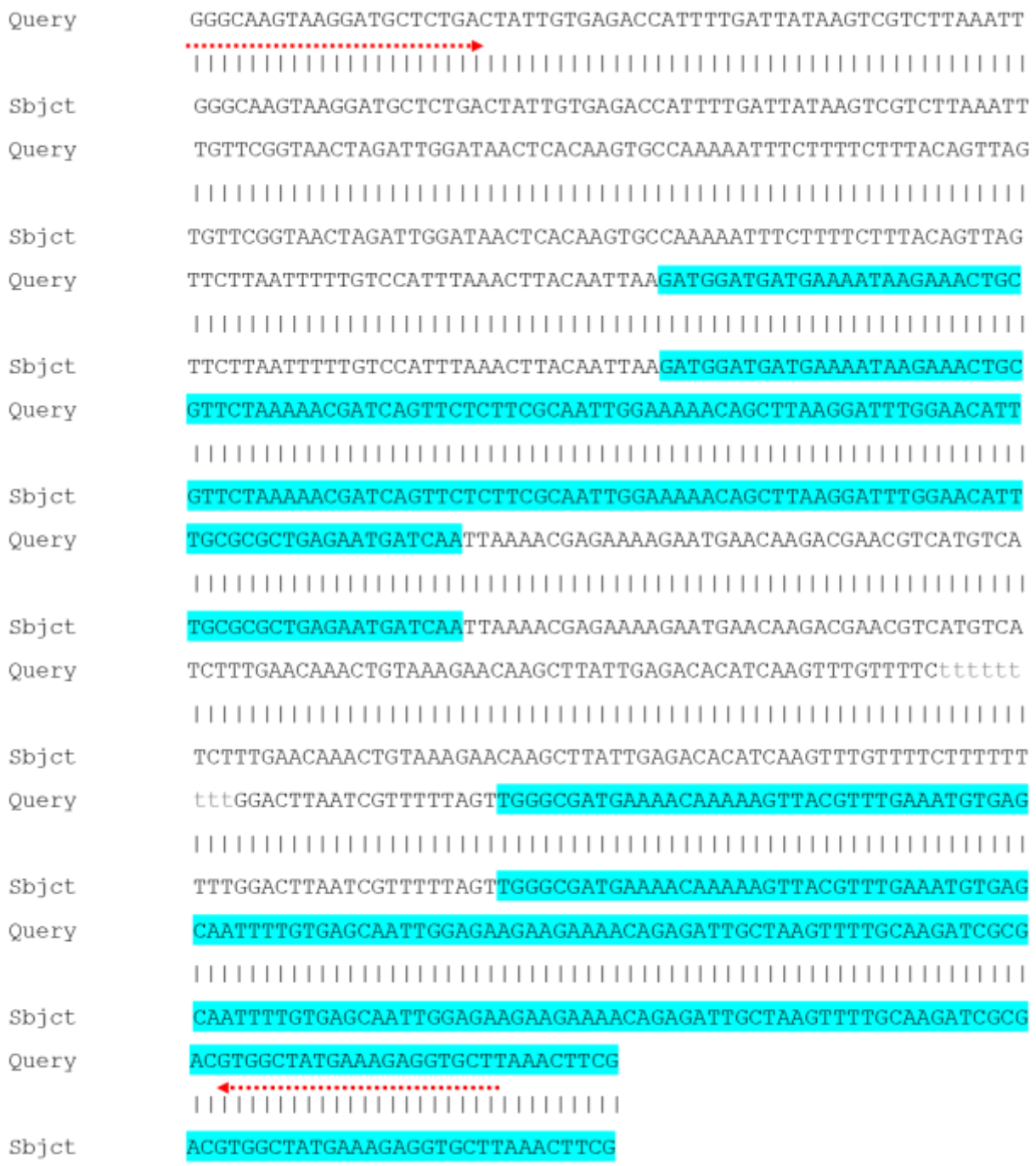
Figure 1. Perineal pattern in mature female of *M. incognita* collected from Guilan province (Bar = 20 µm).



شکل ۲. قطعات تکثیر شده از ژنوم ۱۰ جمعیت از نماتد ریشه‌گرهی جمع‌آوری شده از باغات کیوی‌فروت استان‌های مازندران و گیلان با آغازگرهای اختصاصی. **A.** Inc-K14، **B.** SEC-1، **C.** Fjav/Rjav، **D.** Far/Rar، **E.** Fh-Rh. چاهک‌ها به ترتیب: L (نشانگر ۱۰۰ جفت باز)، ۱: کنترل منفی، ۲ تا ۱۱: نمونه‌ها (Ra-P1، Ra-P2، Ra-P3، Ra-P4، To- D1، To- D2، La-S1، La-S2، R-U1 و R-U2).

Figure 2. Amplified fragments of the genome of 10 populations of root knot nematode collected from kiwifruit orchards of the Guilan and Mazandaran provinces with specific primers. **A.** Inc-K14, **B.** SEC-1, **C.** Rjav/Fjav, **D.** Far/Rar, **E.** Fh-Rh. Lines respectively: L: 100 bp DNA Ladder, 1: negative control, 2-10: Samples (Ra-P1, Ra-P2, Ra-P3, Ra-P4, To-D1, To- D2, La-S1, La-S2, R-U1 and R-U2).

در این ارزیابی، جهت بررسی دقیق‌تر، از دو جفت آغازگر متفاوت Inc-K14 (تکثیر ناحیه SCAR) و SEC-1 (تکثیر ژن کدکننده یکی از پروتئین‌های غدد مری موسوم به *sec-1*) (Randig *et al*. 2002; Tesarova *et al*. 2003) برای شناسایی اختصاصی گونه *M. incognita* استفاده شد. جفت آغازگرهای اختصاصی Inc-K14 قطعه‌ای به طول ۳۹۹ جفت‌باز و جفت آغازگرهای اختصاصی SEC-1 قطعه‌ای به طول ۵۰۲ جفت‌باز را تکثیر کردند (شکل ۲). زیر هم چینی توالی نوکلئوتیدی بدست آمده در این مطالعه با جفت آغازگرهای SEC-1 و موقعیت آغازگرهای مورد استفاده در شکل ۳ نمایش داده شده است.



شکل ۳. زیر هم چینی توالی نوکلئوتیدی ژن کد کننده پروتئین SEC-1 به دست آمده در این مطالعه با توالی موجود در پایگاه NCBI توالی‌یابی شده توسط (Tesarova *et al*. 2003).

Figure 3. Alignment of the nucleotide sequences of the gene encoding for the SEC-1 pharyngeal protein sequenced in present study with the available sequence in GenBank database deposited by Tesarova *et al*. (2003).

نتایج به دست آمده در این بخش از تحقیق، با نتایج مطالعات برخی محققان که از این آغازگرهای اختصاصی استفاده نموده‌اند، مطابقت نشان داد (Tesarova *et al*. 2003; Devran & Sogut 2009). تاکنون چندین نشانگر مولکولی و آغازگر اختصاصی برای شناسایی گونه *M. incognita* استفاده گردیده است اما مطالعات محدودی با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی SEC-1 برای شناسایی این گونه انجام شده است (Tesarova *et al*. 2003; Adam *et al*. 2007; Niu *et al*. 2011; Subbotin *et al*. 2021).

در این تحقیق، علاوه بر دو جفت آغازگر اختصاصی Inc-K14 و SEC-1 گونه *M. incognita*، از آغازگرهای اختصاصی Fjav/Rjav برای *M. javanica*، Far/Rar برای *M. arenaria* و Fh/Rh برای *M. hapla* نیز استفاده گردید. نتایج حاصله مشخص کرد که با هیچکدام از این آغازگرها، قطعه‌ای تکثیر نشد (شکل ۲). این یافته‌ها نشان دهنده اختصاصی بودن آغازگرهای مذکور است. نتایج به دست آمده از شناسایی نماتد ریشه‌گرهی کیوی‌فروت، با نتایج محققان دیگر در خصوص اطمینان از اختصاصی بودن، همخوانی و مطابقت نشان داد (Barros *et al*. 2018; Akyazi & Felek 2013). مطالعه Akyazi & (2013) Felek با استفاده از آغازگرهای عمومی و دو جفت آغازگر اختصاصی SCAR و SEC-1 نشان داد تنها گونه *M. incognita* در باغات کیوی‌فروت استان اردو ترکیه رواج دارد. همچنین Devran & Sogut (2009) به شناسایی گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی با استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی مبادرت نموده و مشخص کردند گونه *M. incognita* رایج‌ترین گونه نماتد ریشه‌گرهی در طول مدت مطالعه آنها در ترکیه بوده است. به طریق مشابه، Dong *et al*. (2001) با روش‌های ریخت‌شناختی و PCR با آغازگرهای Rjav/Fjav، Inc-k14-F/ Inc-k14-R و Rh/Fh طراحی شده بر پایه SCAR، گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی را در کشورهای اروپایی و آفریقایی شناسایی و گزارش نمودند که همه جمعیت‌ها، گونه *M. javanica* هستند. همچنین یافته‌های حاصل از بررسی حاضر، با تحقیق انجام شده در کشور کره جنوبی در خصوص شناسایی گونه *M. incognita* به کمک آغازگر SEC-1، مشابهت نشان داد (Hwang *et al*. 2016).

بنابراین، باتوجه به دامنه میزبانی وسیع نماتدهای ریشه‌گرهی و ایجاد آلودگی‌های گسترده، پی‌بردن به نقش آنها به عنوان عامل خسارت‌زا، از درجه اهمیت خاصی برخوردار است. بدون شک کاربرد نهال سالم و نظارت مستمر بر نهالستان‌های کیوی‌فروت، از راهکارهای مدیریت نماتد ریشه‌گرهی است که در سایه شناسایی و ردیابی مؤثر آن امکان‌پذیر خواهد بود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد استفاده از آغازگر اختصاصی SEC-1 که برای اولین بار در کشور مورد آزمون قرار می‌گیرد، قادر است جهت پایش و شناسایی گونه *M. incognita* به کار رفته و فراهم کننده تمایز بین گونه‌ای باشد. کاربرد روش‌هایی از این دست، می‌تواند نواقص روش‌های تشخیص بر پایه ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی و همچنین تکثیر غیر اختصاصی گونه‌ها با آغازگرهای ناحیه SCAR را مرتفع ساخته و به عنوان یک ابزار مولکولی قابل اطمینان، جهت ردیابی مورد استفاده قرار گیرد.

References

Abad P, Favery B, Rosso MN, Castagnone-Sereno P, 2003. Root-knot nematode parasitism and host response: Molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology* 4: 217–224.

Akyazi F, Felek A, 2013. Molecular identification of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* from kiwi fruit orchards in Ordu province, Turkey. *Türkiye Entomoloji Dergisi* 37 (4): 449–456.

Adam MAM, Phillips MS, Blok VC, 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology* 56: 190–197.

Alvarez-Ortega S, Brito JA, Subbotin S, 2019. Multigene phylogeny of root-knot nematodes and molecular characterization of *Meloidogyne nataliei* Golden, Rose and Bird, 1981 (Nematoda: Tylenchida). *Scientific Reports* 9 (1): 1–11.

Arzanlou M, Ghasemi Esfahlan S, Khodaei S, Tavakoli M, Babaei Ahari A, 2016. Molecular diagnostics of *Biscogniauxia mediterranea*, the causal agent of charcoal rot disease on oak using species-specific primers. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 5 (2): 175–186.

Barros AF, Campos VP, Souza LN, Costa SS, Terra WC, *et al.*, 2018. Morphological, enzymatic and molecular characterization of root-knot nematodes parasitizing vegetable crops. *Horticultura Brasileira* 36 (4): 473–479.

Blok VC, Powers TO, 2009. Biochemical and molecular identification. In: Perry RN, Moens M, Starr JL (eds). Root-knot Nematodes. CABI Publishing, Wallingford, UK. Pp. 98–118.

Calderon-Urrea A, Vanholme B, Vangestel S, Kane SM, Bahaji A, *et al*, 2016. Early development of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *BMC Development Biology* 16: 1–14.

Chen P, Peng DL, Zheng JW, 1990. Description of a new

root-knot nematode *Meloidogyne fanzhiensis* sp. *Journal of Shanxi Agricultural University* 10: 55–60.

Chitwood BG, 1949. Root-knot nematodes, part I. A revision of the genus *Meloidogyne göldi*, 1887. Proceedings of the Helminthological Society of Washington 16: 90–104.

Da Silva AT, Penna JCV, Goulart LR, Santos MA, Arantes NE, 2000. Genetic variability among and within races of *Heterodera glycines* ichinohe assessed by RAPD markers. *Genetic Molecular Biology* 23: 323–329.

Devran Z, Sogut MA, 2009. Distribution and identification of root-knot nematodes from Turkey. *Journal of Nematology* 41: 128–133.

Dong K, Dean RA, Fortnum BA, Lewis SA, 2001. Development of PCR primers to identify species of root knot nematodes: *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* and *M. javanica*. *Nematropica* 31: 271–280.

Eisenback JD, Triantaphyllou HH, 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: Nickle WR (ed). Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker, Inc., USA. Pp. 191–274.

Eskandarzadeh N, Moslehi Sh, Vaez N, 2020. Evaluation of the effects of Thorne-apple and henbane on egg hatching and mortality of juveniles of *Meloidogyne javanica*. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 9 (2): 45–60.

FAO, FAOSTAT, Production, 2020. http://www.Fao.org

Fourie H, Zijlstra C, Mcdonald A, 2001. Identification of root-knot nematode species occurring in South Africa using the SCAR-PCR technique. *Nematology* 3 (7): 675–680.

Gasser RB, 2001. Identification of parasitic nematodes and study of genetic variabilitusing PCR approaches. In: Kennedy MW, Harnett W (eds). Parasitic Nematodes: Molecular Biology, Biochemistry and Immunology. CABI, UK. Pp. 53–82.

Ghasemi Esfahlan S, Arzanlou M, Babayahri A, Torbati M, Narmani A, 2019. Morphological and molecular characterization of endophytic fungi from oak trees in arasbaran forests. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 8 (1): 1–17.

Golmohammadi M, Ghasemi M, Banihashemian SN, 2019. The study of tolerance or sensitive of kiwifruit varieties to the Bacterial Canker. 1st Iranian Plant pathology Congress.Tehran-Karaj. *Proceedings of the 1th Iranian plant pathology Congress*, Karaj, Iran, P. 342. (In Persian).

Hajihassani A, Lawrence KS, Jagdale GB, 2018. Plant parasitic nematodes in Georgia and Alabama, In: Subbotin SA, Chitambar JJ (eds). Plant Parasitic Nematodes in Sustainable Agriculture of North America, Vol. 2 Springer International Publishing, USA. Pp. 357–391.

Hartman K, Sasser JN, 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential hosts test and perineal pattern morphology. In: Barker KR, Carter CC, Sasser J.N (eds). An advanced Treatise on Meloidogyne. Volume II: Methology. North Carolina State University, USA. Pp. 69–77.

Hasan ST, Abood ID, Abd Al Rasoul AM, 2020. Diagnostic of new species of root knot nematode (*Meloidogyne cruciani*) associted with egg plant in babylon governorate/Iraq based on morphological characters and molecular methods. *Ecology, Environment and Conservation* 26 (1): 69–74.

Hussey RS, Janssen GJW, 2002. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: Starr JL, Cook R, Bridge J (eds). Plant Resistance to Parasitic Nematodes. CABI Publishing, Wallingford, UK. Pp. 43–70.

Hwang SM, Jang KS, Choi YH Choi GJ, 2016. Development of an efficient screening method for resistance of chili pepper plants to *Meloidogyne incognita*. *Horticultural Science and Technology* 34 (2): 282–293.

Janssen T, Karssen G, Verhaeven M, Coyne D, Bert W, 2016. Mitochondrial coding genome analysis of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne*) supports haplotype based diagnostics and reveals evidence of recent reticulate evolution. *Scientific Reports* 6: 22591.

Jones JT, Haegeman A, Danchin EGJ, Gaur HS, Helder J, Jones MGK, 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14: 946–961.

Hewezi T, Baum TJ, 2013. Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors. *Molecular Plant Microbe Interaction* 26: 9–16.

Karssen G, 2002. The plant-parasitic nematode genus *Meloidogyne goldi*, 1892 (Tylenchida) in Europe. Brill, Leiden, Netherlands. 157 pp.

Kofoid CA, White WA, 1919. A new nematode infection of man. *Journal of the American Medical Association* 72: 567–569.

Neal JC, 1889. The root-knot disease of the peach, orange and other plants in Florida, due to the work of Anguillula. Bulletin 20, Division of Entomology, US Department of Agriculture.

Niu JH, Guo QX, Jian H, Chen CL, Yang D, Liu Q, Guo YD, 2011. Rapid detection of *Meloidogyne* spp. by LAMP assay in soil and roots. *Crop Protection* 30 (8): 1063–9.

Quentin M, Abad P, Favery B, 2013. Plant parasitic nematode effectors target host defense and nuclear functions to establish feeding cells. *Frontiers in Plant Science* 4: 53.

Randig O, Bongiovanni M, Carneiro RM Castagnone-Sereno P, 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome* 45 (5): 862–870.

Ray C, Abbott, AG, Hussey, RS, 1994. Trans-splicing of a *Meloidogyne incognita* mRNA encoding a putative esophageal gland protein. *Molecular and Biochemical Parasitology* 68 (1): 93–101.

Salgado SML, Guimarães NMRB, Botelho CE, Tassone GAT, Marcelo AL, *et al.*, 2015. *Meloidogyne paranaensis* e *Meloidogyne exigua* em lavouras cafeeiras na s. região sul de Minas Gerais. *Coffee Science, Lavras* 10 (4): 475–481.

Sellers GS, Jeffares DC, Lawson B, Prior T, Lunt DH, 2021. Identification of individual root-knot nematodes using low coverage long-read sequencing. *Plos One* 16 (12): e0253248.

Sikora R, Coyne D, Hallmann J, Timper P, 2018. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 3rd edition, CABI Publishing, Wallingford, UK. 888 pp.

Subbotin SA, Rius JEP, Castillo P, 2021. Systematics of root-knot nematodes (Nematoda: Meloidogynidae). Brill.

Tao Y, Xu C, Yuan C, Wang H, Lin B, *et al.*, 2017. *Meloidogyne aberrans* sp. nov.(Nematoda: *Meloidogynidae*), a new root-knot nematode parasitizing kiwifruit in China. *PloS One* 12 (8): e0182627.

Tesarova B, Zouhar M, Rysanek P, 2003. Development of PCR for specific determination of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Protection Science* 39: 23–28.

Thoden TC, Korthals GW, Termorshuizen AJ, 2011. Organic amendments and their influences on plant-parasitic and free-living nematodes: A promising method for nematode management. *Nematology* 13: 133–153.

Taylor DP, Netscher C, 1974. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. *Nematologica* 20 (2): 268–269.

Treub M, 1885. Onderzoekingen over sereh-ziek suikkeriet gedaan in s'Lands plantentium te Bbuitenzorg. *Mededeelingen uit's Lands Plantentium, Batavia* 2: 1–39.

Yang Y, Hu X, Liu P, Chen L, Peng H, *et al.*, 2021. A new root-knot nematode, *Meloidogyne vitis* sp. nov.(Nematoda: Meloidogynidae), parasitizing grape in Yunnan. *Plos One* 16 (2): e0245201.

Zijlstra C, Donkers-Venne DTHM, Fargette M, 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2: 847–853.

Zeng J, Zhang Z, Li M, Wu X, Zeng Y, *et al.*, 2018. Distribution and molecular identification of *Meloidogyne* spp. parasitising flue-cured tobacco in Yunnan, China. *Plant Protection Science* 54: 183–189.

This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)